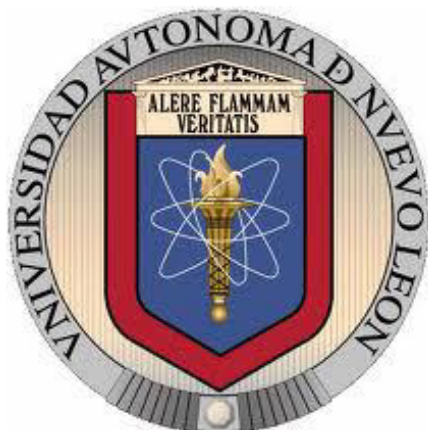


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**COINFECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA CON PATÓGENOS
ASOCIADOS A ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN EL NORESTE DE
MÉXICO**

POR

LBG. ARELY MARINA RODRÍGUEZ MÁRQUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

MAYO, 2017

**COINFECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA CON PATÓGENOS
ASOCIADOS A ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN EL NORESTE DE
MÉXICO**

Comité de Tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Dr. Mario A. Bermúdez de León

Dra. Laura M. Trejo Ávila

Dr. Fermín Mar Aguilar

**COINFECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA CON PATÓGENOS
ASOCIADOS A ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN EL NORESTE DE
MÉXICO**

Dirección de Tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez

INDICE

1. TABLA DE CONTENIDO	I
2. NOMENCLATURA	II
3. RESUMEN	III
4. INTRODUCCIÓN	1
5. ANTECEDENTES	3
5.1. Infecciones respiratorias agudas	3
5.2. Epidemias	4
5.3. Virus de Influenza	5
5.4. Estructura del virus	6
5.5. Genoma del virus de la Influenza	8
5.6. Ciclo de replicación del virus	9
5.6.1. Adsorción viral	11
5.6.2. Entrada del virus	12
5.6.3. Síntesis de RNA viral	12
5.6.4. Síntesis de proteínas virales	13
5.6.5. Morfogénesis del virus	13
5.6.6. Salida de la progenie viral	14
5.7. Generación de nuevos virus de Influenza	14
5.8. Variabilidad de Neuraminidasa, Hemaglutitina y Proteína de Matriz	17
5.9. Coinfección del virus de Influenza con otros patógenos	19
5.10. Importancia del diagnóstico de Influenza	21
6. HIPÓTESIS	25
7. OBJETIVOS	25
7.1. Objetivo general	
7.2. Objetivos particulares	
8. MATERIALES Y MÉTODOS	26
8.1. Estrategia Experimental	26
8.2. Procesamiento de las muestras de Influenza	27
8.3. Extracción de ácidos nucleicos totales	27
8.4. Cuantificación de los ácidos nucleicos totales	28
8.5. Síntesis de los DNA complementarios al RNAm (DNAc's)	28
8.6. Amplificación mediante PCR Multiplex	29

8.7.	Purificación de las muestras de DNAc's	30
8.8.	Fragmentación y marcaje de los DNAc's	31
8.9.	Hibridación, lavado y escaneado de las muestras	31
8.10.	Análisis e interpretación de los resultados	33
8.11.	Análisis de correlación	34
9.	RESULTADOS	35
9.1.	Detección de diferentes tipos del virus de la influenza	35
9.2.	Detección de los diferentes tipos de virus de influenza	36
9.3.	Detección de la infección y/o coinfección de patógenos	44
9.4.	Correlación del virus de la influenza y otros patógenos	63
9.5.	Análisis de Influenza AH1N1 y patógenos asociados	70
10.	DISCUSIÓN	73
11.	CONCLUSIONES	77
12.	REFERENCIAS	78

2. NOMENCLATURA

· °C	Grados centígrados
· µg	Microgramos
· µL	Microlitros
· DNA _c	DNA complementario
· RNA _c	RNA complementario
· DNA	Acido desoxirribonucleico
· DTT	Ditiotreitol
· dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
· EB	Buffer de Elución
· g	Gramos
· HA	Hemaglutinina
· IRA	Infecciones Respiratorias Agudas
· mg	Miligramos
· MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
· min	Minutos
· ml	Mililitros
· mM	Milimoles
· ng	Nanogramos
· nt	Nucleótido
· pb	Pares de bases
· PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
· pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrogeno
· RNA	Acido ribonucleico
· rpm	Revoluciones por minuto
· M	Proteína de Matriz
· mRNA	RNA mensajero
· NA	Neuraminidasa
· NANA	Acido Siálico
· NEP	Proteína de Exportación Nuclear
· NP	Nucleoproteína
· OMS	Organización Mundial de la Salud
· PB	Buffer de Unión
· PE	Buffer de lavado
· RNP	Ribonucleoproteína
· qPCR	PCR tiempo real
· SSA	Secretaria de Salud
· TdT	Transferasa de Desoxinucleótidos Terminales
· UDG	Uracilo-DNA Glicosilasa
· RNA _v	RNA viral

3. RESUMEN

En la última década, nos hemos enfrentado a algunos agentes etiológicos emergentes y más recientemente la pandemia generada por el virus de la influenza. A pesar de que la influenza tiene una tasa baja de fatalidad, el gran número de personas infectadas hace que las pandemias y epidemias de influenza sean un problema grave para la población, por otro lado las complicaciones a salud que resultan de las coinfecciones bacterianas aumentan el riesgo de muerte en las personas afectadas. Debido a lo anterior, el objetivo de esta tesis es determinar la presencia de diferentes tipos y subtipos del virus de la influenza así como coinfecciones con patógenos asociados a enfermedades respiratorias para contribuir a la vigilancia sobre la epidemiología molecular del virus de influenza en el Noreste de México. Para ello, la estrategia experimental consistió en la extracción de los ácidos nucleicos totales de las muestras colectadas y la transcripción inversa para convertir los RNAs virales a DNAs. Estos se amplificaron por medio de PCR multiplex, se fragmentaron, se marcaron con biotina y se hibridaron en el microarreglo RPM- Flu 3.1, el cual fue lavado, fijado y escaneado para el análisis de las secuencias nucleotídicas identificadas usando el ensayo de microarreglos basado en la re-secuenciación. Los resultados mostraron la presencia del virus influenza AH1N1 en el 78% de las muestras del Noreste de México analizadas y se determinó la infección simultánea con patógenos como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Adenovirus*, *Mycoplasma*, *Herpesvirus* y *Klebsiella*. De las 219 muestras analizadas, el 59% fueron positivas para influenza AH1N1/pdm09 y estaban asociadas al menos a un patógeno (23%), seguido de dos con 19%, tres con 15% y cuatro patógenos en el 2%. El análisis de la asociación más frecuente del virus de Influenza AH1N1 se encontró con los patógenos de los géneros *Streptococcus* (37.4%), *Haemophilus* (30.1%) y *Pseudomonas* (20%) y la correlación positiva se encontró con bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Neisseria*. Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de detectar la aparición de nuevos re-arreglos específicos del gen NA y HA del virus de influenza en pacientes del Noreste de México. Así mismo, los patógenos asociados a los virus de influenza se deberán analizar en un mayor número de casos para contribuir a la prevención mediante vacunación así como su tratamiento y de esta manera reducir la morbilidad y mortalidad en la población.

4. INTRODUCCION

Las enfermedades emergentes y re-emergentes son un peligro latente para la población. El virus de la influenza AH1N1 denominada inicialmente como influenza porcina, sufre constantes mutaciones que introducen nuevas variables génicas capaces de provocar brotes epidémicos o pandemias ocasionando un problema de salud pública. La mayor parte de la mortalidad causada por los virus de la influenza A puede ser evitada por la vacunación anual; sin embargo, dicha medida no está asociada con una completa protección debido a la continua evolución de la estructura antigénica del virus.

La vigilancia de los tipos y subtipos de los virus de la influenza circulantes es fundamental para la mejora del manejo de la enfermedad y es especialmente importante para la detección temprana que permita identificar rápidamente la propagación de brotes, también es importante la detección de nuevas variantes del virus de la influenza, o emergencia de nuevos patrones de resistencia.

El virus influenza tipo A, pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* siendo este el que presenta mayor prevalencia en esta patología ya que esta afecta a una gran diversidad de organismos, con una amplia diversidad de signos clínicos en la cual están involucrados diferentes factores los cuales están principalmente relacionados con el ambiente, el hospedero, pero sobre todo con la cepa del virus. Los virus influenza están clasificados en 3 tipos (A, B, C); basados en las propiedades antigénicas de dos proteínas internas (M y NP): A a su vez el tipo A se subtipifica según las características antigénicas que presentan dos proteínas de superficie: la Hemaglutinina (HA) y la Neuroaminidasa (NA). Hasta el momento se conocen 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA.

El virus de la influenza puede evadir la respuesta inmune del huésped a través de mutaciones puntuales (denominadas de deriva) en las glicoproteínas de superficie como la hemaglutinina y neuraminidasa o por la recombinación de segmentos genómicos entre diferentes virus que co-infectan la misma célula (recombinación del virus de distinto origen), lo cual conducen a la formación de una nueva cepa con re-arreglos en las

proteínas HA y NA para el caso de influenza A y linajes para el virus de influenza B como son, B/Yamagata/16/88 (Yam88) y el B/Victoria/02/87 (Vic87).

Estas nuevas variables génicas son capaces de provocar brotes epidémicos o pandemias ocasionando un problema de salud pública. La vigilancia del virus de la influenza es fundamental para la mejora del manejo de la enfermedad y es especialmente importante para la detección temprana de los virus que permita identificar rápidamente la propagación de brotes y detección de nuevas variantes del virus de la influenza. Para ello se requiere realizar la vigilancia epidemiológica molecular con el uso de técnicas moleculares que en conjunto permitan conocer de inmediato y de manera precisa cual es el virus circulante, para un manejo adecuado y prevención de epidemias.

En reportes previos de pandemias causadas por el virus de la influenza se ha descrito que gran parte de las muertes atribuibles a la infección por este virus ocurren como consecuencia del desarrollo de neumonías bacterianas. Las principales complicaciones respiratorias asociadas a la influenza son la neumonía primaria, neumonía bacteriana secundaria, neumonía por patógenos inusuales y exacerbaciones de enfermedad pulmonar crónica. Los estudios experimentales muestran que por el aumento de los mecanismos de unión e invasión bacteriana, de replicación viral y modificaciones en la respuesta inmune, las bacterias actúan sinérgicamente con el virus influenza.

Para ello, en la presente tesis, utilizamos un microarreglo de DNA y re-secuenciación para el análisis de las secuencias nucleotídicas de los virus de influenza así como los patógenos asociados en pacientes con enfermedades respiratorias de los estados del Noreste del País para contribuir a la vigilancia sobre epidemiología molecular del virus de influenza.

5. ANTECEDENTES

Infecciones Respiratorias Agudas

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) son un variado grupo de enfermedades causadas por agentes que afectan diversas zonas de las vías respiratorias. Los signos y síntomas de las IRA constituyen tos de menos de 15 días de duración, dificultad para respirar, estridor, dolor o enrojecimiento faríngeo, otalgia, otorrea, rinorrea, y obstrucción nasal. Las IRA son infecciones leves como resfriado o catarro, faringitis, amigdalitis, bronquitis, otitis, o enfermedades graves como la neumonía.

Las IRA son causadas tanto por agentes bacterianos como virales. Entre las bacterias que causan estas infecciones están *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus B hemoliticus*, siendo *Streptococcus pneumoniae* el de mayor porcentaje de asociación. Los agentes virales más comunes son el virus Sincitial Respiratorio (RSV), parainfluenza, influenza y coxsackie, entre otros. Las infecciones respiratorias por virus comúnmente desencadenan condiciones serias que pueden resultar en la hospitalización de aquellos pacientes que además padecen una condición crónica.

La influenza epidémica es responsable de morbilidad y mortalidad significativa con un serio impacto social y económico a través del mundo (WHO, 2005). Cada año el virus de la influenza tipo A causa de tres a cinco millones infecciones graves en humanos y 0.25 a 0.5 millones de personas mueren por influenza en todo el mundo (WHO, 2005). En México la afección se transmite con rapidez durante las epidemias estacionales y afecta de 10 a 20% de la población. Desde el 2009, la vigilancia epidemiológica de influenza en México se ha mantenido ininterrumpida. Durante todo el 2013 se detectaron un total de 36,023 casos sospechosos a influenza, de los cuales 4,480 se confirmaron mediante PCR tiempo real. De todos los casos confirmados a influenza se registraron 314 defunciones, resaltando que el 95% de estas correspondieron a pacientes que presentaban una o varias comorbilidades crónicas y/o no se vacunaron para la prevención de influenza estacional (SINAVE/DGE/Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Influenza, 2014). Durante el 2017 se han notificado 5 220 casos

positivos para influenza, los niveles registrados son similares a los observados durante el 2016 y mayores a los niveles observados durante la temporada 2013-2014 (PHAO/OPS, 2017).

Epidemias de Influenza

La influenza es responsable de la alta tasa de morbilidad y mortalidad con gran impacto social y económico a nivel mundial (WHO, 2005). Datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2014) indican que, a nivel mundial, las epidemias causadas por los virus de influenza producen hospitalización y fallecimiento de las personas, sobre todo en grupos de alto riesgo como infantes, ancianos y enfermos crónicos. Se ha documentado que una pandemia por virus de influenza ocurrida en el año 1918 llegó a producir cerca de 50 millones de casos fatales.

Al menos cuatro pandemias de influenza han ocurrido en el siglo XIX y otras tres ocurrieron en el siglo XX. La pandemia de "influenza española" ocurrida entre los años 1918 y 1919 causó un número estimado de 21 millones de fallecimientos a nivel mundial. Esta pandemia produjo la introducción de la influenza AH1N1. Otras pandemias de influenza asiática aparecieron en el año 1957 A H2N2 y la gripe de Hong Kong en el año 1968 AH3N2 (Phillipe, 2010).



Figura 1. Cronología de pandemias del virus de Influenza. A lo largo del tiempo el virus de influenza ha causado pandemia en todo el mundo, desde el primer brote registrado en Rusia 1889, seguido por la aparición de nuevos tipos y subtipos de virus de Influenza.

Existe un reporte reciente de casos fatales en China producidos por el subtipo AH7N9 (Hualan, 2013), este es un virus de origen aviar muy transmisible entre humanos.

Actualmente, existen vacunas diseñadas para proteger en contra de los tipos y subtipos del virus de Influenza, al menos 3 tipos comunes de Influenza se encuentran co-circulando y comúnmente cada año se producen vacunas nuevas. En el año 2014 las vacunas producidas (FluArix, FluLaval, FluZone y FluMist) se recomendaron de forma cuadrivalente contra los tipos AH1N1 pdm 09 (A/California/7/2009), AH3N2 estacional (A/Texas/50/2012) y B (B/Massachusetts – B/Brisbane) (CDC, 2014).

En el 2016 los casos reportados de influenza fueron aislados y muy por debajo de los niveles esperados para la temporada, predominando el subtipo A H3N2 (WHO, 2016).

En el año 2017 se ha observado un decremento de los casos de influenza en el norte de América y se observa un ligero incremento en los casos positivos de México, predominando el virus AH1N1 pdm 09, AH3N2 y B (WHO, 2017).

Virus de influenza

Los virus de la influenza son miembros de la familia *Orthomyxoviridae* y son clasificados en los géneros A, B y C, de los cuales la influenza tipo A han sido aislados de humanos, caballos, cerdos, focas, ballenas y de una gran variedad de especies de aves, esto es contrastante en comparación con el virus de influenza B que ha sido aislado solo de humanos (Nerome, 1998).

Hay diferencia concluyente entre la enfermedad resultante por la infección causada por el virus de influenza entre diversas especies. Así como también hay variaciones en la severidad de la enfermedad. La infección producida por los virus en mamíferos es usualmente localizada y confinada al tracto respiratorio.

Los virus de influenza A, B y C pueden ser distinguidos en la base de sus diferencias antigénicas entre sus nucleoproteínas (NP) y proteínas de matriz (M). Ambos virus influenza A y B contienen 8 segmentos genómicos de RNA, mientras que el virus de

influenza C contiene solo 7 segmentos genómicos de RNA. Todos estos virus pueden infectar naturalmente al hombre, sin embargo sólo el virus de la influenza A ha sido responsable de todas las pandemias (Bouvier y Palesse 2008; Suzuki 2005).

Los virus de la influenza A y B son los más relevantes clínicamente, ya que causan infecciones respiratorias severas, en niños principalmente e individuos con problemas pulmonares o sistemas inmunes suprimidos.

El virus de influenza B fue aislado por primera vez en 1940 y desde entonces ha continuado circulando en humanos contribuyendo cada año a la actividad epidémica de influenza. Los virus de la influenza B comenzaron como un grupo homogéneo e iniciaron a divergir en dos linajes antigénicamente distinguibles hasta 1970 (Biere et al., 2010). Estos dos linajes son genéticamente distintos, el B/Yamagata/16/88 (Yam88) y el B/Victoria/02/87 (Vic87) en 1986 y 1987 (Nerome, 1998). Los virus de influenza B no son clasificados en subtipos basados en los genes HA y NA, como los virus de influenza A (Rong Yang, 2012).

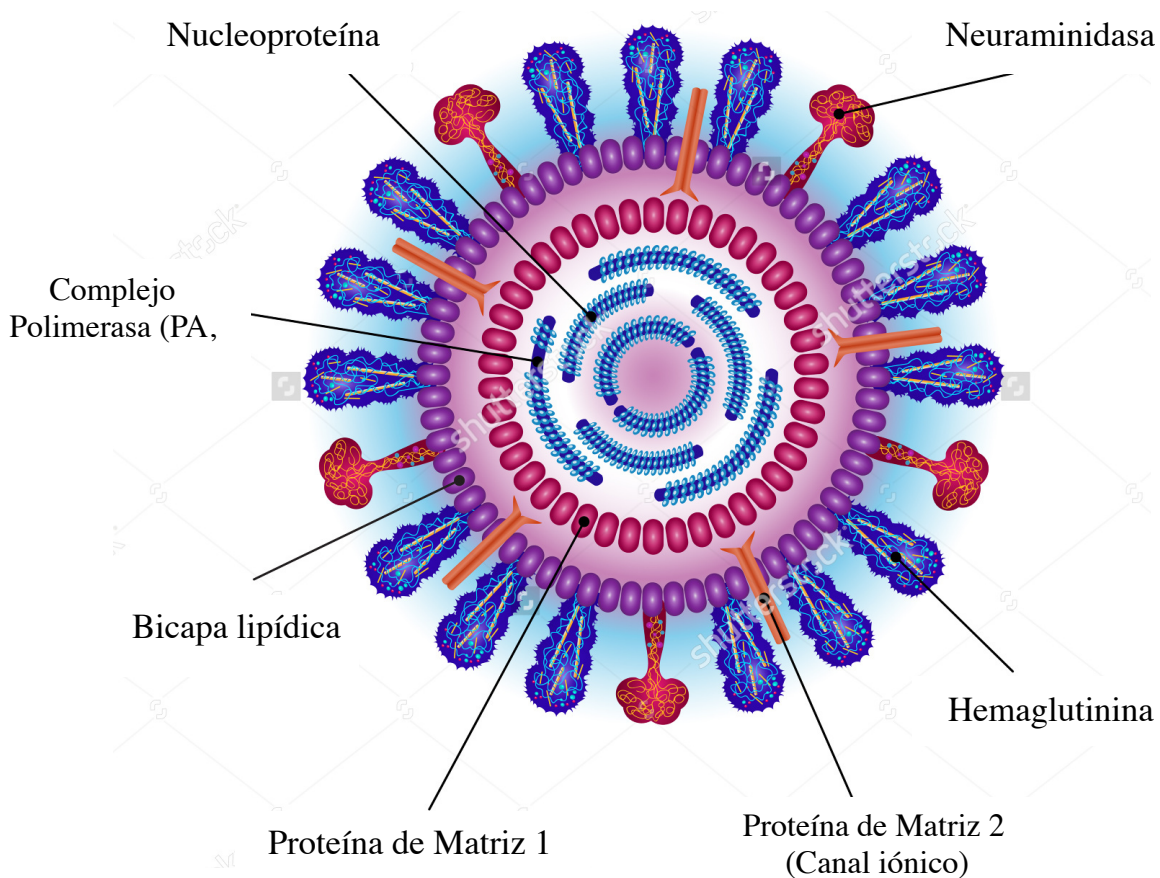
Es importante mencionar que los anticuerpos contra un tipo de influenza o subtipo confieren protección limitada o nula contra otro tipo o subtipo y los anticuerpos contra un tipo o subtipo antigénico de influenza puede no conferir inmunidad a una nueva variante antigénica del mismo tipo o subtipo. Los virus de influenza B sufren de deriva antigénica de forma más lenta comparada con los virus de influenza A. Los virus de influenza A y ambos linajes de virus de influenza B han co-circulado en las temporadas de influenza recientes (WHO, 2014).

Estructura del virus de Influenza

Los virus de influenza A y B son virtualmente indistinguibles mediante microscopía. En La Figura 2 se puede observar que el virus de la influenza A está formado por glicoproteínas en forma de pico “spikes” de HA y NA, en un radio de aproximadamente cuatro a uno, derivado de una membrana lipídica de la célula hospedera. Un menor

número de canales iónicos de la proteína de matriz (M2) atraviesan la envoltura lipídica. La envoltura del núcleo está constituida por tres proteínas de membrana hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y M2 y por encima la proteína de matriz M1 que encierra el núcleo viral. Interno a la matriz M1 se encuentra la proteína nuclear de exportación (NS2) y el complejo de ribonucleoproteína (RNP) compuesto por segmentos de RNA virales recubiertos por la nucleoproteína (NP) y la RNA polimerasa, compuesta de dos subunidades de polimerasas básicas y una ácida (PB, PB2 y PA).

La organización del virus de la influenza B es similar a la influenza A, con cuatro proteínas de envoltura: HA, NA, M1 y en lugar de la proteína de matriz M2 se encuentra BM2 (Bouvier, 2008).



Tomado de www.MedicalEcology.org

Figura 2. Estructura del virus de influenza A. El virus de influenza contiene 8 fragmentos de RNA viral, y está definido por dos glicoproteínas en la superficie del virión. El primer paso de infección con el virus es mediado por la glicoproteína membranal HA que permite la unión y fusión a las células

hospedera y la NA que facilita la exportación y salida de la célula hospedera. Estas dos glicoproteínas exhiben gran diversidad estructural y, al menos, 18 HA y 11 NA han sido identificadas hasta la fecha. Sólo los subtipos con hemaglutinina H1, H2 y H3, así como neuraminidasas N1 y N2 están circulando en la población humana.

Genoma del virus de la Influenza

El genoma del virus de la influenza A y B consiste de ocho segmentos de RNA de cadena simple. Hay ocho segmentos que codifican para siete proteínas que constituyen la partícula viral (PB, PB2, PA, HA, NA, NP y M1) y al menos tres proteínas no estructurales que son encontradas sólo en la célula infectada (M2, NS1 y NS2). Además de una proteína no estructural adicional (NB) que es encontrada sólo en el virus de la influenza tipo B.

Los 8 segmentos de los virus influenza A y B (y los 7 segmentos del virus de influenza C) son numerados según su longitud, en orden decreciente. Los segmentos 1, 3, 4 y 5 de influenza A y B codifican para las proteínas PB2, PA, HA, y NP, respectivamente. Todos los virus de la influenza codifican la subunidad PB1 de la polimerasa en el segmento 2. El segmento 6 del virus de influenza A codifica sólo para la proteína NA, mientras que el mismo segmento en el virus de la influenza B codifica para NA y para la proteína de matriz NB. La proteína NB es una parte integral de membrana correspondiente a la proteína M2 de influenza A. El segmento 7 de los virus de influenza A y B codifica para la proteína de matriz M1. En el genoma de influenza A, la proteína M2 es también expresada a partir del segmento 7 por un procesamiento de splicing alternativo, mientras que para influenza B codifica su proteína de membrana BM2 en un marco de lectura alternativo (Tabla 1). Para los virus A y B, el segmento 8 codifica para la proteína NS1 (antagonista de interferón) y por splicing del RNAm, la NEP/NS2, la cual está involucrada en la exportación de las ribonucleoproteínas virales del núcleo de la célula hospedera.

La organización genómica del virus de influenza C, con siete segmentos, es similar a la organización de los virus A y B, con la excepción que la proteína HEF reemplaza las proteínas HA y NA (Bouvier y Palesse, 2008).

Tabla 1. Segmentos genómicos del virus de Influenza

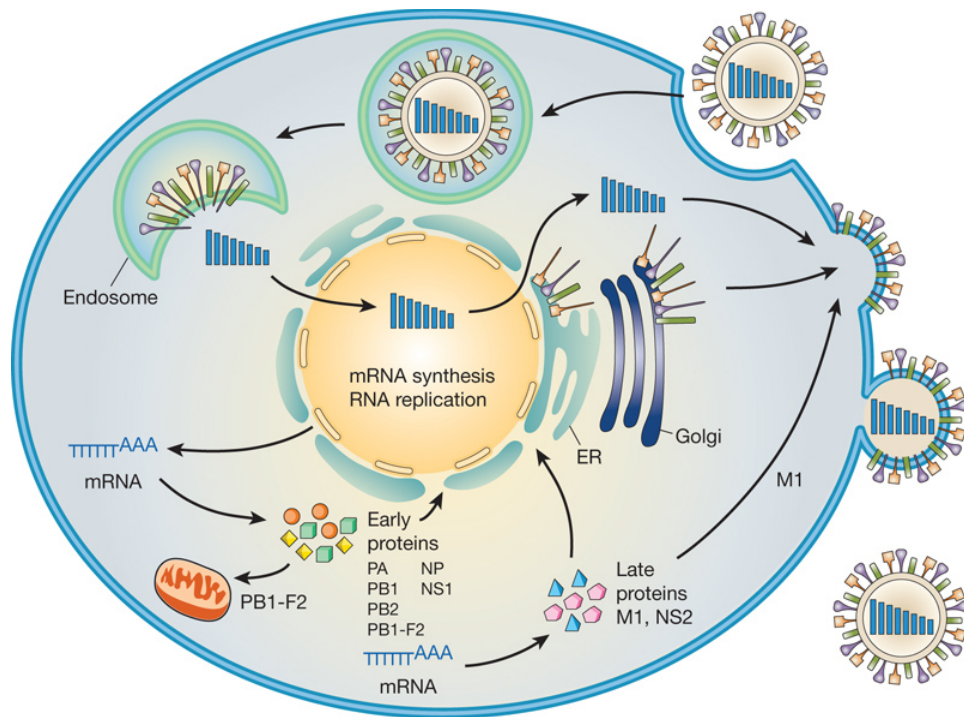
Segmento	Codificación	Funciones conocidas
4	Hemaglutinina (HA)	Receptor de unión, fusión de membrana a la célula
6	Neraminidasa (NA)	Facilita la salida de nuevos virus producidos
	NB	Proteína integral de membrana (análoga a la proteína M2 en Influenza A)
7	Matriz 1 (M1)	Interactúa con el genoma y el factor nuclear de exportación, asiste el ensamblaje viral
	Matriz 2 (M2)	Canal iónico, controla el pH en golgi durante la síntesis de HA y en la desvoltura del virión
5	NP	Nucleoproteína (cápside) y síntesis viral
Complejo de transcripción		
1	PB-2	Subunidad de unión, polimerasa, determinante de virulencia
2	PB-1	Subunidad catalítica de la RNA polimerasa
3	PA	Subunidad viral RNA polimerasa
8	No estructurales (NS)	
	NS1	Control post-transcripcional, antagonista interferón
	NEP/NS2	Exportación nuclear de RNA viral, ensamblaje viral

Tomado de Hilleman, 2002 y Bouvier, 2008

Ciclo de replicación de Influenza

Como se muestra en la Figura 3 en la etapa inicial de la replicación del virus de influenza, la HA viral se une al ácido siálico en la superficie de la célula hospedera y el virus entra a la célula por medio de una endocitosis mediada por receptor. El pH ácido del endosoma abre los canales iónicos M2, resultando en una acidificación del interior del virus, éste proceso es necesario para la liberación de las ribonucleoproteínas (RNP) al citoplasma. Posteriormente, las RNP son translocadas al núcleo donde la polimerasa de RNA dependiente de RNA transcribe y replica el RNA viral de sentido negativo ((-)RNA_v) formando tres tipos de moléculas de RNA: RNA complementario de sentido

positivo ((+)RNAc), el cual se utiliza como templado para sintetizar más RNA viral. Los RNAs pequeños virales de sentido negativo (svRNAs) regulan el cambio de transcripción a replicación; y, los RNAs, que son exportados al citoplasma para su traducción. Las proteínas virales que son necesarias para la replicación y transcripción son translocadas al núcleo mientras que las proteínas estructurales (HA, NA y M2) son llevadas a la membrana celular. Las RNP son entonces exportadas al citoplasma y llevadas a la membrana celular con ayuda de la proteína M1 y NEP para el ensamblaje. La salida del virus de influenza de la célula hospedera es mediada por la actividad sialidasa de la NA, que destruye el ácido siálico de las glicoproteínas celulares.



Tomado de www.nature.com

Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la influenza A. La endocitosis del virus es mediada por la HA, las ribonucleoproteínas virales (RNPv) se liberan en el citoplasma y, posteriormente, se transportan al núcleo, donde tienen lugar la replicación y transcripción. Los RNAm se exportan al citoplasma para su traducción. Las proteínas tempranas virales necesarias para la replicación y la transcripción son transportadas de vuelta al núcleo, mientras que las proteínas tardías M1 y NS2, facilitan la exportación nuclear de las RNPv's recién sintetizadas. El montaje y la gemación de los viriones recién formados, es llevada a cabo en la membrana plasmática.

Adsorción del virus

Los virus influenza reconocen el ácido N-acetylneuramínico (siálico) en la superficie de la célula hospedera. Los ácidos siálicos son monosacáridos ácidos de nueve carbonos comúnmente encontrados en el extremo terminal de muchos glicoconjugados que están presentes en muchos tipos de células y en muchas especies animales. El carbono-2 terminal del ácido siálico puede unirse a el carbono-3 o el carbono-6 de galactosa, estas diferentes uniones resultan en configuraciones estéricas únicas del ácido siálico terminal. La fracción de ácido siálico es reconocida y unida por los “spikes” en la superficie de los virus influenza, los cuales tienen una especificidad preferencial para uniones -2,3- o uniones -2,6-. En las células epiteliales de la tráquea de humanos las uniones -2,6- predominan; en el epitelio del intestino de patos son más comunes las uniones -2,3-. El ácido siálico con uniones terminales -2,3- está también presente en el epitelio respiratorio humano, pero en menor abundancia. Consecuentemente, los humanos y otros primates pueden ser infectados por virus de influenza aviar, aunque con menos eficiencia que con otras cepas humanas. La expresión diferencial de ácido siálico en el tracto respiratorio de los mamíferos puede explicar la baja infectividad y alta patogenicidad de algunas cepas de virus aviar. En humanos, las proteínas de ácido siálico con uniones -2,3- suelen ser menos abundantes y más prevalentes en tracto respiratorio bajo (bronquiolos y alveolos). Los pulmones no son accesibles a partículas virales transportadas por aire como es el tracto respiratorio alto (nasofaringe, senos paranasales, tráquea, y bronquios). Por lo tanto, la infección con el virus aviar es relativamente rara en humanos, sin embargo cuando una cepa aviar infecta el pulmón humano resulta en una neumonía severa con grados de fatalidad que exceden el 60%.

Durante la replicación viral, la proteína HA es cortada por serin-proteasas en HA1 y HA2; esta modificación post-traducciona es necesaria para la infectividad del virus. Se cree que la HA2 media la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular. La HA1 contiene el receptor y los sitios antigénicos variables. Las mutaciones en múltiples sitios antigénicos resultan en una cepa viral que no será efectivamente neutralizada por anticuerpos del hospedero, lo que lo hace susceptible a infecciones.

Entrada del virus

Una vez que la proteína HA del virus influenza se une al ácido siálico, el virus es endocitado. La acidificación del compartimento endosomal es crucial para que el virus pueda liberarse de su envoltura por dos caminos. Primero, el bajo pH conduce a un cambio conformacional en la HA, exponiendo un péptido de fusión que media la fusión de la envoltura con la membrana endosomal, de esta manera abre un poro a través del cual las RNPs son liberadas en el citoplasma celular. Segundo, los iones de hidrógeno desde el endosoma son bombeados dentro de la partícula viral vía la proteína de canal iónico M2. La proteína M2 es el blanco de las amantadinas, drogas anti-influenza que bloquean la actividad del canal iónico y previenen la liberación de la envoltura. La acidificación interna del virión de influenza disgrega las interacciones proteína-proteína internas, permitiendo que las RNPs sean liberadas al citoplasma (Maeno 1994).

Síntesis de RNA

Una vez liberadas del virión, las RNPs son transportadas al núcleo celular por medio de señales de localización nuclear de proteínas virales, las cuales dirigen proteínas celulares para importar las RNPs. El núcleo es la localización de toda la síntesis de RNA viral, tanto de los RNA mensajeros poliadenilados y con capuchón (cap) que actúan como templado para la traducción de proteínas virales en la célula hospedera como de los segmentos de RNA que forman el genoma de la progenie viral. La RNA polimerasa viral usa el RNA viral de sentido negativo como templado para la síntesis de dos especies de RNA positivo: RNA mensajeros y RNA complementario (RNAc), intermediario. Los RNAs positivos sintetizados son utilizados en la transcripción subsecuente de las nuevas copias de RNA genómico viral (RNAv). El tallo de Poli(A) de los RNA del virus influenza está codificado en el RNAv como una fracción de 5 a 7 residuos de uracilo. El “capping” de los RNA mensajeros ocurre de una manera única en la cual las proteínas PB1 y PB2 capturan los oligonucleótidos capeados de los transcritos pre-RNA_m del hospedero para iniciar la síntesis del RNA_m viral, este proceso es llamado “secuestro del capuchón”. La transcripción da lugar a 8 transcritos primarios (7 en caso de influenza

tipo C). Dos de estos segmentos dan lugar a un transcrito primario que puede tener un procesamiento alternativo de su RNAm, dando como resultado dos transcritos alternativos. El segmento M da lugar a dos RNAs alternativos que codifican para la proteína M1 y la proteína M2.

Los RNAm virales son transportados y traducidos igual que los mensajeros celulares, sin embargo la exportación nuclear de los segmentos de RNAv es mediada por las proteínas M1 y NEP/NS2. La proteína M1 interactúa con los RNAv y las NP formando con estos dos componentes el complejo RNP, M1 se asocia con la proteína NEP de exportación nuclear, la cual media la exportación nuclear de M1-RNP al citoplasma por vía de las nucleoporinas (Bouvier y Palesse, 2008).

Síntesis de proteínas

Las proteínas de envoltura HA, NA, y M2 son sintetizadas por los RNAm virales en los ribosomas unidos a la membrana de retículo endoplásmico, donde son plegadas y transportadas al aparato de golgi para modificaciones post-traduccionales. Las tres proteínas tienen señales apicales que las dirigen hacia la membrana celular para el ensamble del virión. Se cree que M1 que juega un papel en conducir el complejo RNP-NEP en contacto con las proteínas de envoltura para el embalaje con la membrana del hospedero (Bouvier y Palesse, 2008).

Morfogénesis del virus

Los virus de influenza no son completamente infecciosos a menos que los viriones contengan un genoma completo de 8 segmentos (7 para influenza C). El empaquetamiento de los RNAv no es un proceso aleatorio en el cual los segmentos se incorporan al azar. Nuevas evidencias sugieren que es un proceso selectivo en el cual señales discretas de empaquetamiento de todos los segmentos de RNAv aseguran que un genoma completo sea incorporado en la mayoría de las partículas virales (Bouvier y Palesse, 2008).

Salida de la progenie del virus

El brote de los virus influenza ocurre en la membrana celular y probablemente inicia con la acumulación de proteína de matriz M1 en el bicapa lipídica del lado del citoplasma. Los “spikes” de HA se unen por el ácido siálico en la membrana celular, hasta que las partículas virales son activamente liberadas por la actividad sialidasa de la proteína NA.

La NA es un tetrámero en forma de hongo anclado a la envoltura viral por un dominio transmembranal y posee actividad destructora del receptor. Los residuos de ácido siálico cortados de las glicoproteínas de la superficie celular y gangliósidos liberan la progenie viral de la célula hospedera. La NA también remueve residuos de ácido siálico de la misma envoltura viral con lo que previene agregación de partículas virales. La NA también ayuda a la infectividad por rompimiento de la mucina en secreciones del tracto respiratorio y permite al virus penetrar a través del epitelio respiratorio (Maeno, 1994).

Generación de nuevos virus de Influenza

Existen dos formas distintas para la generación de nuevos virus de influenza, la Figura 4 explica la generación por Salto génico y por Deriva antigénica. Un nuevo virus es producido a partir del salto génico y se caracteriza por un cambio abrupto, resultando en un subtipo del virus de influenza con una nueva combinación de HA y NA, por lo que cuando este cambio ocurre, la población no tiene inmunidad contra el virus. Este tipo de cambio ocurre ocasionalmente y puede saltar de una especie a otra provocando pandemias. El cambio mediante deriva génica es un pequeño cambio en los genes del virus de influenza que ocurren durante la replicación del virus, este cambio produce virus que son muy parecidos a otros y comparten las mismas propiedades antigénicas por lo que un sistema inmune expuesto a estos virus serán fácilmente reconocidos.

Hay muchos factores que determinan si una especie puede actuar como hospedera de una infección. El factor más evidente es el contacto prolongado entre el hospedero y el

patógeno de la infección a ocurrir. Esto hace que algunas especies tengan más probabilidad de infectarse que otras. El reservorio natural de los virus de la influenza son las aves acuáticas en las cuales los virus parecen haber alcanzado un nivel óptimo de la adaptación al anfitrión. La transmisión entre las aves ocurre directa o indirectamente a través de aerosoles, contaminación fecal del agua, de los alimentos, o de otros materiales.

Los virus de influenza A son los que presentan mayor variabilidad, además de su potencial pandémico dada su gran mutabilidad y la capacidad de recombinación por tener la característica de poseer un genoma segmentado, esto es debido a que el virus tiene múltiples hospederos capaces de transmitirse el virus entre sí. En los últimos años, estudios de epidemiología molecular han revelado cuales son los principales subtipos del virus influenza que circulan en la población aviar. Durante su replicación, estos virus pueden acumular mutaciones e intercambiar genes durante coinfecciones con la consecuente emergencia de nuevas cepas.

La infección en aves se extiende desde la infección asintomática, la enfermedad respiratoria leve, a una enfermedad severa y rápidamente fatal, lo que conlleva a la muerte del animal. Los virus aviarios de la influenza capaces de causar brotes de enfermedad severa en pollos o pavos se clasifican como altamente patógenos y se restringen actualmente a los subtipos H5 y H7 (Anders, 2006; de Jong y Hien, 2006).

La preferencia por una especie de hospedero en particular se determina por la unión precisa entre proteínas HA y los receptores que contienen ácido siálico. La HA se une a receptores que contienen ácidos siálicos en su extremo terminal, es ahí donde la unión precisa entre proteína y receptor determina la preferencia por una especie de huésped en particular. Un interruptor es la especificidad del receptor de los ácidos siálicos conectados con galactosa. En aves el enlace es $\alpha 2$ -3 mientras que en mamíferos es de $\alpha 2$ -6. Esta diferencia o impide que los virus de la influenza A crucen la barrera de la especie y se adapten a un nuevo anfitrión. Estudios realizados con HA han demostrado que unas pocas sustituciones de aminoácidos son suficientes para generar cambios en la afinidad del dominio de la proteína hacia su receptor. Además se ha encontrado que

ligeras modificaciones en la estructura secundaria de la proteína puede exponer ciertos residuos que sirven de unión al receptor de una manera más directa que otras conformaciones (Hilleman, 2002).

La influenza frecuentemente causa enfermedades respiratorias en los cerdos. Los cerdos tienen subtipos específicos de estos virus, pero también son susceptibles a cepas humanas y aviarias. Esto se debe en parte a la presencia de ambos tipos de enlaces, $\alpha 2-3$ y $\alpha 2-6$, vinculados a ácido siálico en el epitelio respiratorio. Los seres humanos pueden verse afectados por las cepas transmitidas por los cerdos. Los cerdos son reservorios del virus, y un vehículo para que las cepas de virus puedan tener recombinaciones que pudiesen dar origen a la creación de un subtipo de alta patogenicidad capaz de infectar tanto al hombre como a otros animales (Anders, 2006; de Jong y Hien, 2006).

En cada temporada se forman esporádicamente nuevas cepas debido al reacomodo en el genoma del virus de influenza y debido a que estos reacomodos son normalmente determinantes para su potencial infeccioso es necesario tener investigación constante sobre estos reacomodos y nuevas cepas (Wang, 2006).

Por otro lado, se ha observado en los virus de Influenza B que han sido aislados, una diferencia importante en las secuencias nucleotídicas sobre todo en la secuencia codificante para el gen que codifica a la HA, dichas observaciones han concluido que se tienen viejas y nuevas variantes co-circulando en una misma época en regiones cercanas (Kanegae, 1990). Así mismo hasta 1990 se estimó una tasa de evolutiva aproximada de 2.3×10^{-3} substituciones silenciosas por nucleótido por año en el gen de hemaglutinina (HA) para el virus de Influenza B (König, 2010). Se han investigado las vacunas para Influenza B y en años anteriores se observó una baja eficacia, esto atribuido probablemente a la pobre respuesta inmunológica.

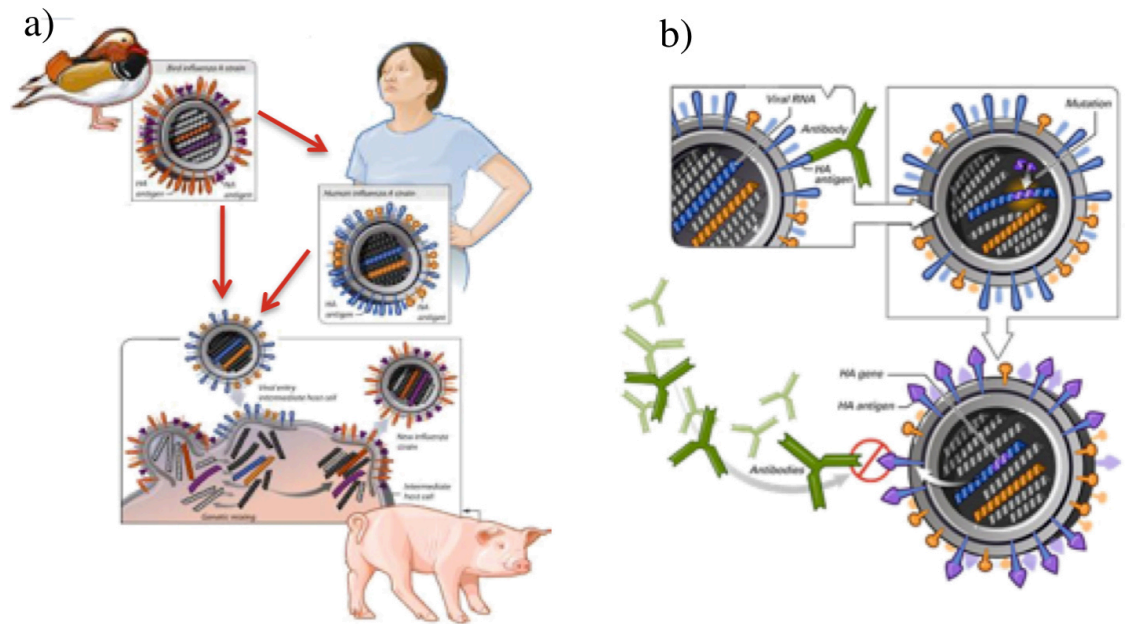


Figura 4. Salto génico y Deriva antigénica de virus de Influenza. El virus sufre intercambio de segmentos génicos con otros tipos de virus de influenza de diferentes hospederos naturales, tales como las aves y cerdos o una serie de mutaciones puntuales conocidas como deriva genética. **a) El Salto génico** se debe a la habilidad del virus de influenza A para infectar animales que viven cercanos a los humanos que propicia una situación en la cual infecciones dobles con virus humano y no humano originan nuevas cepas con composiciones genéticas muy diferentes. Los viriones descendientes pueden contener mezclas de los genes en los genes que codifican para la HA, NA, o ambas. **b) La Deriva antigénica** se debe a mutaciones en el material genético que producen cambios en los polipéptidos víricos, los cuales sufren dos a tres sustituciones de aminoácidos cada año. La capacidad de las cepas de propagarse en la comunidad depende de si se ven afectados los antígenos de HA y NA; pero ya que los cambios cambios antigénicos son menos pronunciados tienden a causar brotes localizados mas que grandes epidemias.

Tomado de: Flu antigenic shift/ drift - www.niaid.nih.gov

Variabilidad de Neuraminidasa, Hemaglutitina y Proteína de Matriz

La NA es la proteína encargada del anclaje entre la célula hospedero y el virus, la secuencia aminoacídica de NA está codificada por el segmento 6. Once subtipos de neuraminidasa están descritos para influenza A y solo un tipo ha sido descrito para influenza B y C. Los nueve tipos de neuraminidasa para influenza A están divididos en dos grupos filogenéticos; el primer grupo consiste en las neuraminidasas N1, N4, N5 y N8 y segundo grupo en N2, N3, N6, N7 y N9.

La NA participa en múltiples funciones del virus, como el anclaje a las mucosas respiratorias, permitiendo así el movimiento hacia la célula blanco y la formación de nuevas partículas virales de la superficie de la célula infectada.

La estructura de la NA conforma 470 residuos aminoacídicos y su estructura tridimensional consiste en dominios como: citoplásmico, transmembranal, cabeza y cubierta. La estructura tridimensional ha sido descrita en los tipos N1, N2, N4, N8, N9 y para el tipo B. Solo el 30% de la estructura es idéntica entre cada tipo.

La HA está codificada por el segmento 4 de RNA. Esta glicoproteína es la más importante y constituye alrededor del 40% de las proteínas del virus. Además, la HA es uno de los antígenos virales contra los que se dirige una parte importante de la respuesta inmunológica neutralizante. El reconocimiento de los anticuerpos por la HA está altamente correlacionado a los cambios conformacionales en los sitios antigénicos (epítopes) de la proteína. La mayor parte de los epítopes se concentran en la región HA1 de la proteína, la cual es la responsable de la antigenicidad. La HA tiene cinco epítopes variables (A, B, C, D y E), cada uno con aproximadamente veinte aminoácidos localizados en la superficie de la proteína (Paglini, 1999).

El receptor celular que necesita la HA viral para poder unirse a la célula susceptible y comenzar la multiplicación viral es el ácido siálico. El mismo está unido a la galactosa mediante una unión α (2,3); algunos subtipos de HA se unen preferentemente mediante unión α (2,6) (Flint S. y cols., 2000). Las hemaglutininas de los virus de aves y equinos se unen preferencialmente a receptores con terminaciones α (2,3), mientras los virus humanos se unen a receptores con terminaciones α (2,6) (Rogers G. y col., 1983). La predominancia de estos receptores en los diferentes tejidos refleja la variabilidad del virus en las diferentes especies.

La proteína M1 es la proteína más conservada del virus y está codificada por el segmento 7 de RNA. Posee dos dominios cuya conformación relativa es flexible. Aunque esta proteína se localiza mayoritariamente en el citoplasma de la célula infectada, posee una señal de localización nuclear y aparece en el núcleo en los primeros tiempos de la infección. La proteína M1 es el factor esencial en la formación de partículas virales (Gomez-Puertas 1999).

La proteína M2 está codificada por un RNAm con expresión mediante splicing diferencial derivado del segmento 7. Es una proteína integral de membrana que se expresa de forma abundante en la membrana plasmática de la célula infectada (Lamb, 2000). La forma biológicamente activa de la proteína es un tetrámero en el que los monómeros están unidos por puentes disulfuro por su zona N-terminal. Las regiones transmembrana de los monómeros forman un canal iónico el cual se activa a pH ácido y es fuertemente selectivo para protones (Mould, 2000). El canal iónico se puede inhibir por amantadina, un antiviral específico para el virus de la influenza A, aunque se han observado excepciones (Xoconostle-Morán, 2013). Se han aislado cepas resistentes al inhibidor cuyas mutaciones se localizan en la proteína M2, a lo largo de la región transmembranal (Hay, 1995).

Con respecto a la resistencia a adamantanos, en el 2013 Xoconostle-Morán en nuestro laboratorio encontró que el 100% de las muestras analizadas presentaron el cambio S31N, el cual es uno de los cambios aminoacídicos más importantes que promueven la resistencia a adamantanos (Astrahan y Arkin, 2011). Esto corrobora que el uso de amantadina y rimantadina no es eficaz para el tratamiento contra el virus de la Influenza A(H1N1) pandémica en México. Estos resultados corresponden a lo anunciado en el boletín informativo sobre la composición recomendada de las vacunas contra el virus de la Influenza en la temporada 2013-2014 del hemisferio norte y el uso de los antivirales contra los virus de Influenza, emitido por la Organización Mundial de la Salud (2013), en el cual se informa que en todas las pruebas realizadas a los virus de la Influenza A(H1N1) pandémica, se encontró el cambio aminoacídico S31N.

Coinfección del virus de Influenza con otros patógenos asociados a enfermedades respiratorias

La coinfección bacteriana es un factor importante en la morbilidad y mortalidad de la Influenza. La neumonía bacteriana que complica la infección por influenza fue una de las principales causas de muerte durante la pandemia de Influenza española de 1918 y durante periodos de actividad de la influenza estacional en los periodos inter-pandémicos. Durante la pandemia de 1918-1919 las bacterias que fueron encontradas

frecuentemente eran bacterias colonizadoras de las vías respiratorias superiores de personas sanas como *Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* y/o *Staphylococcus aureus* (Brundage y Shanks, 2008).

La coinfección bacteriana fue reportada frecuentemente en casos letales durante la influenza A H1N1 pandémica del 2009, siendo *S. pneumoniae* el patógeno mas frecuentemente identificado. Estudios en poblaciones específicas (pacientes críticamente enfermos) demostraron la presencia de coinfección bacteriana en el rango de 18% a 33% de los pacientes con influenza AH1N1 que presentaron neumonía viral. En el 2013, en nuestro laboratorio se encontró que patógenos que se presentaron con mayor porcentaje de asociación con los casos positivos de influenza AH1N1 pandémica fueron *Streptococcus* (40%), *Haemophilus* (36%), *Pseudomonas* (34%) y *Neisseria* (35%) (Willis C., 2013).

Por otro lado la influenza estacional y la influenza B frecuentemente también se complican por infecciones bacterianas. La coinfección bacteriana ha sido encontrada en alrededor del 30% de todos los casos con influenza estacional y los patógenos más frecuentes reportados incluyen *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Torres et al., 2012). Recientemente en nuestro laboratorio se encontró que en muestras de pacientes con influenza B se encuentran asociadas a patógenos bacterianos en el 35% de los casos, siendo más frecuente la coinfección con un solo patógeno (44%), asociación con dos patógenos en un 28%, así como tres patógenos con un 17% y hasta 4 patógenos en un 11% (Rodríguez A., 2014). Estos resultados fueron similares a los encontrados en España (Cilloniz et al., 2012) y Estados Unidos (Louie et al., 2009) ya que mencionan porcentajes de asociación del 33 y 25% respectivamente en el total de las muestras de influenza analizadas.

Estudios recientes muestran que la influenza pandémica AH1N1 puede causar morbilidad y mortalidad significativa en pacientes inmunocomprometidos y confirman la alta tasa de transmisión nosocomial en estos sujetos específicamente. Por lo tanto, la reducción de las defensas de estas personas hospitalizadas favorece el uso prolongado de terapias antivirales y permite el desarrollo de cepas resistentes y se sugiere el desarrollo

de estrategias de vigilancia, aislamiento temprano y vacunación como medidas preventivas para individuos de alto riesgo (Pollara et al., 2013).

Importancia del diagnóstico de Influenza

La influenza varía de año con año y depende en gran medida en el tamaño de la población susceptible, en el cual depende del grado de deriva antigénica que ha ocurrido en las temporadas anteriores (Philippe, 2010). La evolución y deriva génica de los virus de influenza B son más lentos que los cambios en virus de influenza A, sin embargo varios mecanismos de inserción, delección y reacomodo entre los diferentes linajes incrementa la diversidad genética de influenza B y múltiples genotipos pueden co-circular durante un periodo de tiempo en particular así como un área determinada y de ésta forma generar nuevos brotes (Rong Yang, 2012).

Los brotes recientes de gripe aviar y la pandemia de influenza humana postulan la necesidad de un programa constante de vigilancia epidemiológica (Sebastian et al., 2009). La vigilancia mundial de la influenza es fundamental para la mejora del manejo de la enfermedad y, es especialmente importante para la detección temprana que permita identificar y evitar la propagación de brotes e intervenir de manera oportuna para la reducción de los efectos en caso de epidemia. La disponibilidad de tratamientos mejorados y actualizados contra los virus de influenza que circulan en cada temporada ha enfatizado la importancia de un método de diagnóstico eficiente y rápido (Grohskopf, 2013).

Los métodos para el diagnóstico utilizados normalmente son el aislamiento del virus, detección de antígeno y serología, la mayor limitante de éstas técnicas son el tiempo prolongado para completarse, evaluación subjetiva, baja sensibilidad y baja especificidad (Herrmann, 2000; Bruin et al., 2014). Sin embargo, las pandemias por influenza han permitido el desarrollo de una gran cantidad de pruebas serológicas rápidas también denominadas pruebas de escritorio, que indican la presencia del virus pero no tienen la

sensibilidad y ni la especificidad de las pruebas moleculares, así como la capacidad de detectar otros patógenos (Leski 2011; Metzgar 2010, Bell et al., 2014).

La amplificación usando la reacción en cadena de polimerasa mediante tiempo real (qPCR) es utilizado eficientemente para la detección rápida del virus influenza en muestras clínicas, aunque las sustancias inhibitoras presentes en algunas muestras clínicas, puede reducir o bloquear la amplificación del virus en la amplificación (Van Elden, 2001).

Recientemente, se han realizado estudios enfocados al análisis de muestras de influenza aviar mediante microarreglos diseñados para detectar las 16 HA y 9 NA que conforman los subtipos que han sido aislados de aves. Con la ayuda de programas bioinformáticos lograron identificar, subtipificar y determinar el origen geográfico de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos sugieren que la identificación de Influenza por microarreglos identificó exitosamente muestras para 7 distintos tipos de influenza aviar y se obtuvo información útil para el análisis filogenético de las muestras por lo que puede ser ampliamente utilizada para el análisis de muestras, así como complementar el microarreglo con sondas para la detección de patógenos asociados para incrementar el rango de diagnóstico del ensayo (Maughan et al., 2014).

La secuenciación de DNA ha sido la tecnología estándar utilizada en los análisis filogenéticos y para la detección de variantes, sin embargo aunque produce datos precisos es necesario tener bien establecido el conocimiento de las secuencias para analizar y no es tan eficiente para procesar rápidamente sitios múltiples de interés en el genoma, ésta tecnología aunque costosa ha resultado ser práctica en epidemiología y diagnóstico.

Como se muestra en la Figura 5, el uso de la re-secuenciación mediante microarreglos para detectar polimorfismos, permite la identificación de variantes genéticas y provee información epidemiológica importante que es crítica para la vigilancia de nuevos brotes.

La ventaja principal de la detección usando el microarreglo RPM es que no requiere de una unión específica entre la muestra analizada y la prueba, los desajustes que se

presentan pueden añadir valor a la prueba ya que pueden utilizarse posteriormente como marcadores a cepas específicas. El microarreglo RPM es una herramienta poderosa para el análisis de las características genéticas de los nuevos virus circulantes así como el rastreo de variantes ya conocidas del virus de influenza (Quan, 2013).

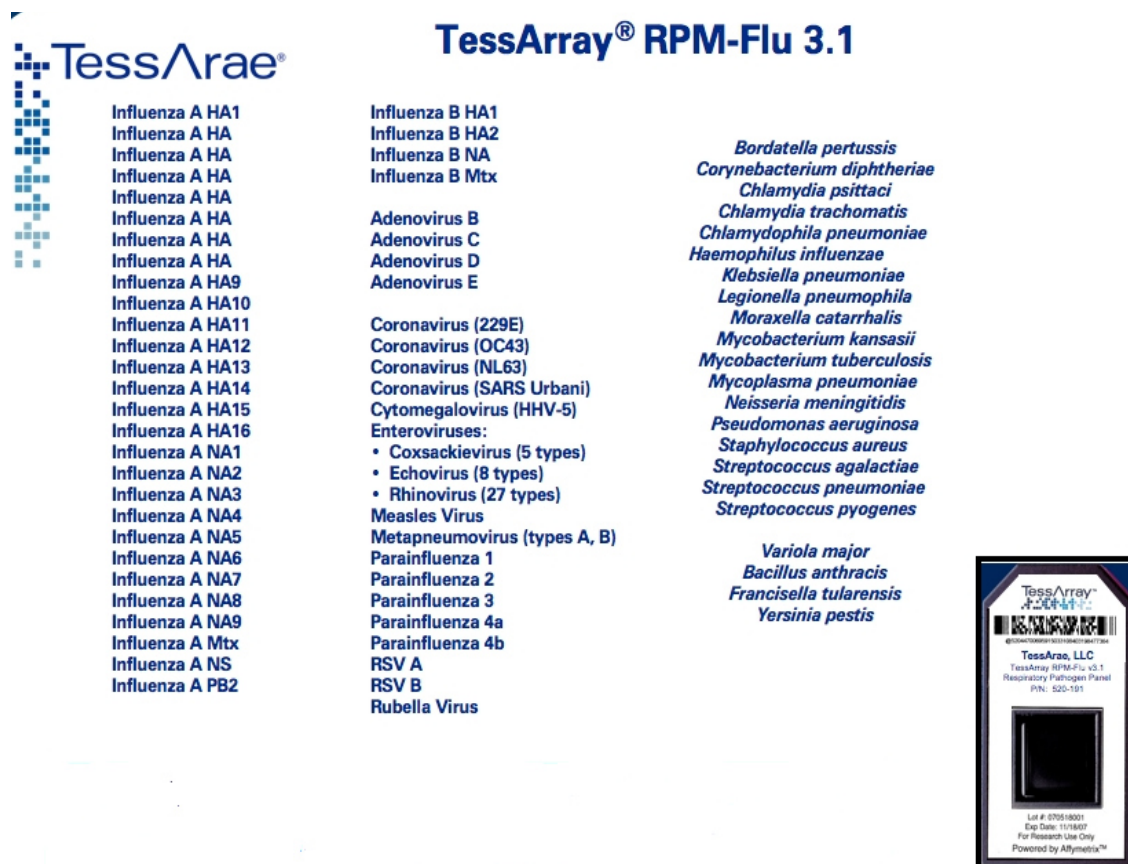


Figura 5. Patógenos respiratorios detectados por el microarreglo RPM-Flu 3.1. Este microarreglo permite la detección simultanea de 86 agentes bacterianos y virales que incluyen influenza A, B, Parainfluenza, Adenovirus, Coronavirus, Rubeola y Citomegalovirus, Enterovirus, Metapneumovirus, Virus Sincital Respiratorio y patógenos microbianos de diversos géneros como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Neisseria* *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Moraxella*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Chlamydia*, *Bordatella*, *Corynebactrium*, *Yersinia*, *Francisella* y *Bacillus*.

Debido a que en nuestro laboratorio se detectaron las coinfecciones del virus de la influenza AH1N1 pandémica y B en México utilizando el microarreglo RPM para la detección simultanea de las bacterias *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* y *Neisseria* asociadas al virus de Influenza A y a la bacterias *Pseudomonas*, *Streptococcus*

y *Haemophilus* asociadas a Influenza B (Willis C. 2013; Rodríguez A., 2014), en la presente tesis, se optimizó el uso de microarreglos de DNA y re-secuenciación para realizar el análisis mas eficiente de las secuencias nucleotídicas de los virus de influenza y patógenos asociados en pacientes con enfermedad respiratoria del estado de Nuevo León.

6. HIPÓTESIS

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los virus de la influenza y de los patógenos asociados, permitirá detectar la presencia de diferentes tipos del virus y los patógenos asociados a enfermedades respiratorias en la población de Noreste de México en el brote de Diciembre 2013 a Enero 2014.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de diferentes tipos del virus de la influenza y su co- infección con patógenos asociados a enfermedades respiratorias en la población del Noreste de México del brote Diciembre 2013 a Enero 2014.

Objetivos particulares

- a) Determinar la presencia de diferentes tipos del virus de la influenza en la población del Noreste de México.
- b) Identificar la infección o coinfección de patógenos asociados a enfermedades respiratorias en las muestras de influenza.
- c) Analizar la correlación de patógenos detectados en los casos positivos para influenza en muestras del Noreste de México.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Estrategia Experimental

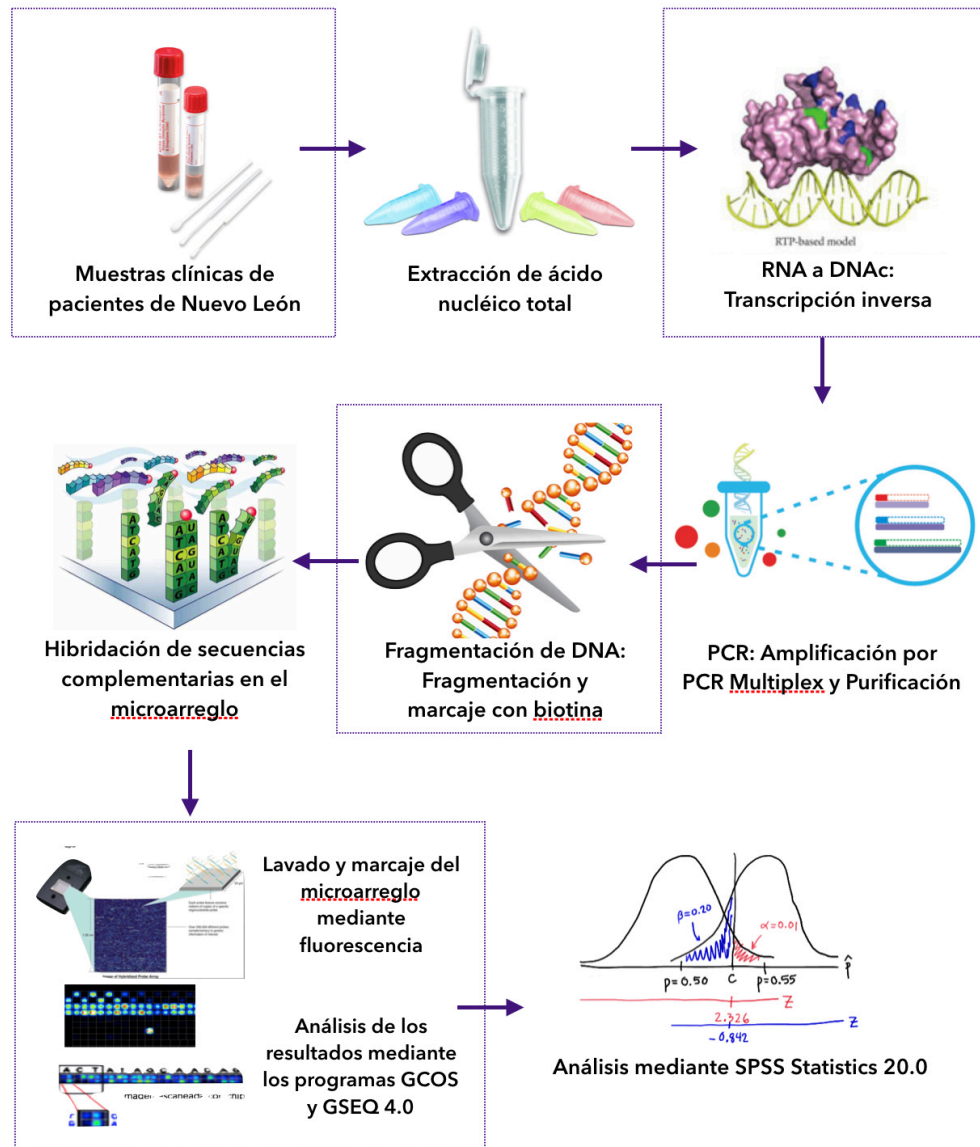


Figura 6. Estrategia experimental para el análisis de las secuencias nucleotídicas de Influenza y patógenos asociados. La estrategia consistió en el uso del microarreglo RPM-FLU 3.1 para lo que se realizó la extracción de los ácidos nucleicos totales de las muestras de influenza y la transcripción inversa para la conversión de los RNAs virales a DNAc. Posteriormente, se amplificó por medio de PCR multiplex, se fragmentó, se marcó con biotina y se hibridó en el microarreglo que fue lavado, fijado y escaneado para el análisis de las secuencias nucleotídicas mediante GCOS y el análisis estadístico a través de SPSS 20.0.

Análisis de la presencia de diferentes tipos del virus de la influenza en la población del Noreste de México usando el microarreglo RPM-Flu 3.1

8.2 Procesamiento de las Muestras de Influenza

Se procesaron 219 muestras de exudados faríngeos, las cuales fueron proporcionadas por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste-IMSS, Monterrey, Nuevo León (CIBIN).

8.3 Extracción de ácidos nucleicos totales

La extracción de los ácidos nucleicos totales se realizó utilizando el kit de aislamiento de DNA y RNA MasterPure (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA).

A una alícuota de 450 μL de la muestra clínica se le añadieron 450 μL de buffer de lisis 2X T & C y 3 μL de proteinasa K (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se agitó por inversión 15 veces y posteriormente se incubó a 65°C por 15 min. Durante ese periodo, se realizó agitación con vórtex cada 5 min. y se enfrió en hielo por 4 min. De inmediato, se adicionó 450 μL del reactivo de precipitación de proteínas (MPC) y se agitó en vórtex por 10 s. Posteriormente, se centrifugó a 10,000g por 10 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido fue separado en dos tubos de 1.5 mL, obteniendo así 650 μL en cada uno de ellos. A continuación, se añadieron 750 μL de isopropanol y fue mezclado por inversión 40 veces. Después, se centrifugó ambos tubos a 10,000g por 10 min a 4°C. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se adicionó 375 μL de etanol al 70% (v/v) a cada tubo. En seguida, fue centrifugado a 10,000g temperatura ambiente por 1 min. Finalmente, se extrajo el etanol cuidadosamente y el precipitado resultante fue solubilizado en 35 μL de Buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

8.4 Cuantificación de los ácidos nucleicos totales

Se cuantificaron las muestras de la extracción de los ácidos nucleicos totales y la calidad de los ácidos nucleicos totales se determinó mediante absorbancia con la relación 260/280 del RNA utilizando el NanoDrop 2000c.

8.5 Síntesis de los DNAs complementarios al RNAm (DNAc's)

Después de la extracción de ácidos nucleicos totales, se realizó la síntesis de DNAc a partir de los RNA usando la técnica de transcripción reversa (RT). Se añadieron 4 μL de ácido nucleicos totales purificados a un tubo RPM-Flu 3.1 (proporcionado por TessArray® RPM-Flu 3.1). Se agitó mediante vórtex y fue centrifugado brevemente. Se incubó a 65 °C por 5 min en un termo ciclador Eppendorf Mastercycler y luego se enfrió en hielo por 5 min. En un tubo Eppendorf de 1.5mL se preparó la mezcla de transcripción reversa como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Preparación de la Mezcla de Transcripción Reversa

Mezcla	1X
Buffer para cadena sencilla 5X	4μL
DTT 0.1M	2μL
RNaseOUT 40 U/ μL	1μL
RNA polimerasa Superscript III 200 U/ μL	1μL
Volumen Total	8μL

Posteriormente, fueron transferidos 8 μL de la mezcla de transcripción reversa al tubo RPM-Flu 3.1 RT, se mezcló por pipeteo y fue colocado en el termociclador Eppendorf Mastercycler programado de la siguiente manera:

- 1) 25 °C por 10 min.
- 2) 50 °C por 50 min.

3) 85 °C por 5 min.

La muestra resultante RPM-Flu 3.1 RT fue colocada en hielo para su posterior amplificación mediante Multiplex PCR.

8.6 Amplificación mediante Multiplex PCR

La muestra RPM-Flu 3.1 RT fue amplificada con 4 diferentes cocteles de cebadores o primers multiplex, por lo que el producto RPM-Flu 3.1 RT fue dividido en 4 tubos RPM-Flu 3.1 PCR mix (A,B,C y D) con 5 μ L en cada uno. En hielo fue preparada la mezcla de PCR Multiplex en un tubo Eppendorf de 1.5 mL como se muestra a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3. Preparación de la Mezcla Maestra PCR Multiplex

Mezcla	1X
Buffer GoTaq Flexi 5X	44μL
MgCl ₂ 25 mM	35.2μL
DNA polimerasa GoTaq 5U/ μ L	8.8μL
UDG 0.22 U / 220 μ L	4.4μL
Volumen Total	21μL

De la mezcla maestra PCRMultiplex, fueron transferidos 21 μ L de a cada tubo RPM-Flu 3.1 PCR Mix (A, B, C y D). Se colocaron los 4 tubos RPM-Flu 3.1 PCR Mix en un termociclador Biorad Peltier DNA Engine Tetrad 2 y se utilizó el siguiente programa:

- 1) 24°C por 10 min.
- 2) 94°C por 2 min.
- 3) 94°C por 30 s.
- 4) 45°C por 30 s.
- 5) Incrementar la temperatura 1°C cada ciclo (20 ciclos)

- 6) 72°C por 1 min y 30 s.
- 7) Ir al paso tres 19 veces*
- 8) 94°C por 30 s.
- 9) 60°C por 2 min.
- 10) Ir al paso siete 29 veces*

Se optimizó el número de ciclos*

Se colocaron los productos RPM-Flu 3.1 PCR en hielo (A, B, C y D)

8.7 Purificación de las muestras de DNAC

La purificación de las muestras amplificadas se realizó utilizando el kit de purificación QIAQuick PCR (QIAGEN, Valencia, CA). A temperatura ambiente se realizó la combinación de los cuatro productos RPM-Flu 3.1 PCR (pooling) en un solo tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le añadieron 1000 μ L de buffer de unión (DNA binding buffer - PB). Se agregaron 700 μ L de la muestra a una columna de purificación Qiagen QIAQuick PCR y fue centrifugado por 30 segundos a 13,000 rpm a temperatura ambiente, la columna se puso en un nuevo tubo de 2 mL. Se repitió el paso anterior con lo que resta de la muestra. La columna fue transferida a un nuevo tubo de 2 mL y se añadió 730 μ L de buffer de lavado (wash buffer - PE) a la columna y fue centrifugado por 30 s a 13,000 rpm a temperatura ambiente. De nuevo la columna fue transferida a un nuevo tubo y se volvió a centrifugar por 30 s a 13,000 rpm a temperatura ambiente para remover todos los trazos de buffer PE. Posteriormente, la columna se volvió a transferir a un nuevo tubo de 1.5 mL y se le adicionaron 25 μ L del Buffer de elución (elution buffer - EB). Esta se dejó reposar la columna por 1 min y fue centrifugada por 30 s a 13,000 rpm a temperatura ambiente. La columna fue desechada y el tubo con la mezcla de productos de PCR Multiplex eluido se colocó en hielo.

8.8 Fragmentación y Marcaje de los DNAC's

Los reactivos que se utilizaron para la fragmentación y marcaje de la muestra son parte del kit de GeneChip Resequencing Assay (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA.) En un

tubo nuevo de 1.5 mL se preparó la Mezcla Master de fragmentación como se muestra a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4. Preparación de la Mezcla de Fragmentación Maestra

Mezcla	1X
Buffer de Fragmentación 10X	2.5μL
Reactivo de Fragmentación 3U/ μ l)	0.1μL
Volumen total	2.6μL

Al tubo que contiene la mezcla de fragmentación maestra se le adicionó el pool del producto del PCR Multiplex eludido y se mezcló por pipeteo. Posteriormente, se colocó la muestra en un termociclador Eppendorf Mastercycler y se utilizó el programa siguiente:

- 1) 37 °C por 5 min.
- 2) 95 °C por 10 min.

El producto resultante de la amplificación Multiplex fragmentada fue colocado en hielo mientras se prepara la mezcla de marcaje. Posteriormente, en un nuevo tubo de 1.5 mL se preparó la siguiente Mezcla de marcaje como se muestra a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5. Preparación de la Mezcla de Marcaje

Mezcla para Marcaje	1X
Buffer TdTAffymetrix 5X	7.2μL
Reactivo de marcaje Affymetrix	1.2μL
TdT Affymetrix TdT 30U/ μ L	2μL
Volumen Total	10.4μL

Al tubo que contiene el producto Multiplex PCR se le adicionaron 10.4 μ L de la mezcla master de marcaje. Posteriormente, se colocó el tubo en un termociclador y se utilizó el siguiente programa:

- 1) 37 °C por 30 min.
- 2) 95 °C por 5 min.

Se colocó el producto resultante marcado Multiplex PCR en hielo mínimo 5 min antes de agregarle la mezcla de hibridación.

2) Identificar la infección o coinfección de patógenos asociados a enfermedades respiratorias en las muestras de influenza.

8.9 Hibridación, lavado y escaneado de las muestras

El análisis de patógenos asociados al virus de la influenza en la población del Noreste de México se realizó simultáneamente usando el microarreglo RPM-Flu 3.1.

Se incubaron los microarreglos en la cámara de hibridación (Affymetrix GeneChip Microarray modelo 640) por un mínimo de 10-15 min a temperatura ambiente. Mientras que los microarreglos permanezcan en incubación, se abrió el programa GCOS en la computadora y se creó un nuevo documento para cada muestra. Se ingresaron los códigos de barra de cada microarreglo por medio del scanner y se documentó que muestra corresponde en cada microarreglo. En un tubo libre de nucleasas de 1.5 mL se preparó la mezcla de hibridación maestra descrita en la Tabla 6:

Tabla 6. Preparación de la Mezcla Maestra de Marcaje

Mezcla global para Marcaje	1X
Solución de hibridación Affymetrix	94.7μL
B2 oligo concentrado	1.3μL
Volumen total	96μL

Se añadieron 96 μ L de la mezcla de hibridación maestra al tubo que contiene el producto marcado Multiplex PCR y se obtuvo el coctel de hibridación. Posteriormente, se colocaron los tubos en un termociclador Eppendorf Mastercycler y se utilizó el siguiente programa:

- 1) 95°C por 5 min.
- 2) 49° por 5 min.

Se llenó el microarreglo RPM-FLU 3.1 con 120 μ L de la solución de pre-hibridación. Posteriormente, se colocó el microarreglo RPM-FLU 3.1 en el sujetador de la cámara de hibridación modelo 640 del sistema de Instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray y se puso en rotación a 60 rpm por 10 min a 49°C. Después, se le removió la solución de pre-hibridación al microarreglo RPM-FLU 3.1 y se le añadió 120 μ L del coctel de hibridación. Se volvió a colocar en el sujetador de la cámara de hibridación modelo 640 del sistema de Instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray y colocó en rotación a 60 rpm a 49°C por 16 h. Se prepararon 3 tubos de 1.5 mL libres de nucleasas; uno transparente y dos ámbar y se añadieron 500 μ L de solución Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) a un tubo ambar, 500 μ L de solución de Anticuerpos al tubo transparente y 800 μ L del buffer Array holding al segundo tubo ámbar.

8.10 Análisis e interpretación de los resultados

Utilizando la estación de fluidos modelo 450 del sistema de instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray y en el software GCOS, se seleccionó el módulo de la estación de lavado y se inició el “prime”, que consiste en cargar las mangueras del módulo de la estación de fluidos con los buffers Wash A y Wash B. Se tomó el microarreglo RPM-FLU 3.1 del horno de hibridación y se removió el coctel de hibridación del microarreglo e inmediatamente después se le agregó al microarreglo 120 μ L del buffer Array holding. Cuando el “prime” se complete, se seleccionó el protocolo Midi_DNAarray_WS5_450 en el software GCOS y se siguieron las instrucciones en la pantalla. Estas consisten en lo siguiente:

- 1) Se coloca el microarreglo RPM-FLU 3.1 en el sujetador de cartuchos horno de hibridación modelo 640 del sistema de Instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray se selecciona “run” del Menú de la estación de Fluidos.
- 2) Utilizando el escáner, se coloca el microarreglo en el mismo y se escanea usando el software GCOS. Cuando el escaneado del microarreglo sea completado, se remueve del escáner y se almacena a 4°C.
- 3) Posteriormente, se obtiene un documento en formato “.CEL” el cual contiene la imagen del microarreglo.
- 4) Finalmente, se realiza un protocolo de shutdown en el módulo de la estación de fluidos el cual consiste en cambiar los frascos que contienen los buffers Wash A y Wash B por frascos que contienen agua destilada para así realizar el lavado de las mangueras.
- 5) Una vez terminado el lavado se apaga el módulo.

Correlación de patógenos detectados en los casos positivos para influenza en muestras del Noreste de México

8.11 Análisis de correlación

Una vez que se obtuvieron los resultados del análisis de las secuencias nucleotídicas, se realizaron los análisis de correlación entre los casos positivos para influenza y los patógenos asociados a enfermedades respiratorias identificados por el microarreglo RPM-Flu 3.1. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS Statistics 20.0. Se realizaron pruebas de Phi de Pearson para analizar la asociación de los patógenos y el virus de influenza en muestras positivas, así como χ^2 para comprobar la correlación entre patógeno y virus.

9. RESULTADOS

9.1 Detección de diferentes tipos del virus de la influenza en la población del Noreste de México

Ácidos nucleicos obtenidos de las muestras de Influenza provenientes del Noreste de México

Se realizó la extracción de los ácidos nucleicos totales de las muestras de Influenza usando la técnica descrita en la sección de Materiales y Métodos. La calidad y concentración de los ácidos nucleicos en las 219 muestras procesadas se realizó mediante la determinación de la relación Absorbancia 260/280 del RNA utilizando el NanoDrop 2000c. La tabla 9 presenta una muestra representativa de las 219 muestras analizadas con la identificación de la muestra como ID y las concentraciones obtenidas, las cuales variaron desde 8.8 hasta 1686 ng/μl. Las relaciones de Absorbancia 260/280 obtenidas para cada muestra variaron desde 1.37 hasta 1.87, lo que indica una calidad promedio regular con variabilidad en la concentración y calidad de las muestras de ácidos nucleicos totales obtenidos de las diferentes muestras.

Tabla 9. Concentración y Calidad de Ácidos Nucleicos utilizando el NanoDrop2000c

ID muestra	Concentración (ng/μl)	Relación 260/280	Relación 260/230
473	29.2	1.47	0.31
360	31.9	1.57	0.37
387	79.4	1.80	0.71
375	30.4	1.55	0.37
472	31.0	1.63	0.39
464	250.2	1.85	1.17
491	43.0	1.48	0.40
468	57.5	1.73	0.55
470	69.6	1.72	0.68
373	1686.0	1.87	1.85
462	8.8	1.37	0.22
467	21.3	1.78	0.46

466	28.0	1.69	0.71
490	24.4	1.62	0.44
469	25.1	1.42	0.42
376	105.3	1.77	0.57
593	38.0	1.61	0.48
601	14.2	1.68	0.41
592	24.1	1.65	0.36
554	43.5	1.49	0.40

9.2 Detección de los diferentes tipos de virus de influenza

Todos los ácidos nucleicos obtenidos de las 219 muestras fueron procesados en el Microarreglo RPM-Flu 3.1. Los resultados muestran que 170 muestras fueron confirmadas para influenza AH1N1 pandémica y 49 muestras fueron detectadas negativas para influenza AH1N1 pandémica. Por lo que la presencia del virus influenza AH1N1 se detectó en el 78% de las muestras del Noreste de México analizadas. En cuanto a las muestras negativas para Influenza AH1N1/pdm, se detectaron en 3 casos otros subtipos de Influenza A como H3N2 asociados con patógenos bacterianos.

Los resultados de las 170 muestras positivas de influenza se muestran en la Tabla 10 indicando el tipo de influenza encontrado en la muestra, la identificación de la muestra (ID muestra), la secuencia nucleotídica que codifica para el gen de interés con el cual hibridó en el microarreglo (Secuencia identificada), el puntaje C3 (C3 Score), el LC length, el valor de expectativa E (E-value), y la secuencia de la base de datos de TessArae que presenta la mayor similitud con la encontrada en la muestra (Secuencia Comparada).

El tipo de influenza encontrado en las 170 muestras fue influenza AH1N1 pandémica. De las que las secuencia identificadas corresponden a 104 muestras que codifican para el gen de matriz de la influenza AH1N1 pandémica (FLUAM) y 66 muestras que codifican para el gen de la Neuraminidasa de la influenza AH1N1 pandémica (FLUANA1).

El puntaje C3 correspondió en algunas muestra a mayor de 20 indicando la presencia del virus mientras que en otras muestras el puntaje C3 dio entre 10 y 20 lo que indica buena

cobertura de las secuencias identificadas. Así mismo, también se obtuvieron los LC-Len de todas las muestras que variaron desde 8 hasta 248 lo que muestra, la variación de segmentos identificados. La tabla 10 muestra las secuencias que presentaron mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae en su mayoría correspondieron a las secuencias del segmento 7 de la proteína de matriz del virus de influenza A: virus Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds e influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix.

Tabla 10. Muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica detectadas mediante el microarreglo RPM-Flu 3.1

Influenza (ID muestra)	Secuencia Identificada	P. C3	LC-Len	Valor E	Secuencia Comparada
Influenza 373	FLUAM (H5N1) MATRIX	10.775	21	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 383	FLUAM (H5N1) MATRIX	35.835	53	1E-138	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUAM (H3N2)	20.469	34	3E-79	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUANA1 (H5N1)	16.82	29	9E-86	Influenza A virus (A/Ft Carson/WR1446P/2009(H1N1)) segment 6 sequence.
	FLUANS (H5N1)	14.509	36	5E-36	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-019/2014(H1N1)) nuclear export protein (NEP) and nonstructural protein 1 (NS1) genes, complete cds.
Influenza 386	FLUAM (H5N1) MATRIX	13.923	30	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.

Influenza 389	FLUAM (H1N1)	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 390	FLUAM (H5N1) MATRIX	25.061	31	1E-80	Influenza A virus (A/Nicaragua/4444_04/2013(H1N1)) matrix protein 2
	FLUAM (H1N1)	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	FLUANA1 (H5N1)	11.967	23	5E-57	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6
	FLUANS (H5N1)	11.949	35	3E-24	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-059/2014(H1N1)) nuclear
Influenza 391	FLUAM (H5N1) MATRIX	12.833	22	2E-32	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 396	FLUAM (H5N1) MATRIX	13.923	30	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 411	FLUAM (H5N1) MATRIX	89.999	101	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 413	FLUAM (H5N1) MATRIX	75	95	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 417	FLUANA1 (H5N1)	99.067	102	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 423	FLUANA1 (H5N1)	80.067	68	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 435	FLUAM (H1N1)	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
Influenza 438	FLUAM (H1N1)	90.001	90	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
Influenza 441	FLUAM (H1N1)	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.

Influenza 443	FLUAM (H1N1)	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 447	FLUAM (H5N1) MATRIX	29.321	59	7E-86	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 450	FLUAM (H5N1) MATRIX	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 451	FLUAM (H1N1)	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 454	FLUAM (H1N1)	95.031	90	7E-86	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
Influenza 456	FLUANA1 (H5N1)	66.067	48	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 457	FLUANA1 (H5N1)	21.067	51	4E-17	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 459	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 460	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 462	FLUAM (H5N1) MATRIX	13.923	30	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 463	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 467	FLUANA1 (H5N1)	50.739	73	2E-70	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 468	FLUANA1 (H5N1)	20.067	32	4E-06	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
Influenza 469	FLUANA1 (H5N1)	26.844	45	6E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 474	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.

Influenza 484	FLUANA1 (H5N1)	20.339	25	1E-64	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 502	FLUAM (H5N1) MATRIX	35.835	53	1E-138	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUAM (H3N2)	20.469	34	3E-79	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUANA1 (H5N1)	16.82	29	9E-86	Influenza A virus (A/Ft Carson/WR1446P/2009(H1N1)) segment 6 sequence.
	FLUANS (H5N1)	14.509	36	5E-36	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-019/2014(H1N1)) nuclear export protein (NEP) and nonstructural protein 1 (NS1) genes, complete cds.
Influenza 525	FLUANA1 (H5N1)	63.067	61	1E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 526	FLUAM (H5N1) MATRIX	76.061	58	4E-20	Influenza A virus (A/Florida/17/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 527	FLUAM (H5N1) MATRIX	88.765	70	6E-32	Influenza A virus (A/Nicaragua/4444_04/2013(H1N1)) matrix protein 2.
Influenza 528	FLUAM (H1N1)	28.773	89	2E-45	Influenza A virus (A/Illinois/02/2014(H1N1)) segment 7 matrix.
Influenza 532	FLUANA1 (H5N1)	89.201	114	4E-175	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 533	FLUANA1 (H5N1)	40.078	64	4E-38	Influenza A virus (A/Utah/03/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 538	FLUANA1 (H5N1)	16.067	23	2E-80	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.

Influenza 539	FLUANA1 (H5N1)	19.882	32	3E-17	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 540	FLUANA1 (H5N1)	36.035	48	5E-42	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 541	FLUANA1 (H5N1)	54.321	63	0	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 544	FLUANA1 (H5N1)	36.067	44	4E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 545	FLUANA1 (H5N1)	23.067	38	2E-80	Influenza A virus (A/Florida/17/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 548	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 551	FLUANA1 (H5N1)	87.067	98	3E-20	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 552	FLUANA1 (H5N1)	26.067	38	2E-80	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 556	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Ft Carson/WR1446P/2009(H1N1)) segment 6 sequence.
Influenza 558	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Utah/03/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 564	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 565	FLUAM (H5N1) MATRIX	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Illinois/02/2014(H1N1)) segment 7 matrix.
Influenza 574	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.

Influenza 576	FLUAM (H1N1)	33.402	19	3E-73	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 577	FLUANA1 (H5N1)	14.575	19	3E-23	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 578	FLUAM (H5N1) MATRIX	47.266	43	6E-107	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 579	FLUAM (H1N1)	29.876	16	2E-68	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 580	FLUANA1 (H5N1)	25.63	19	3E-66	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 584	FLUAM (H5N1) MATRIX	24.494	42	2E-35	Influenza A virus (A/Florida/17/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 585	FLUAM (H5N1) MATRIX	66.148	55	1E-61	Influenza A virus (A/Florida/17/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 588	FLUANA1 (H5N1)	22.672	31	1E-34	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 593	FLUAM (H5N1) MATRIX	43.117	102	3E-77	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 594	FLUAM (H5N1) MATRIX	18.88	20	6E-25	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 595	FLUAM (H5N1) MATRIX	85.084	115	2E-168	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.

Influenza 597	FLUAM (H1N1)	75.42	60	3E-151	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 598	FLUAM (H5N1) MATRIX	25.061	31	1E-80	Influenza A virus (A/Nicaragua/4444_04/2013(H1N1)) matrix protein 2
	FLUANA1 (H5N1)	11.967	23	5E-57	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6
	FLUANS (H5N1)	93.697	113	0	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-059/2014(H1N1)) nuclear
Influenza 599	FLUAM (H5N1) MATRIX	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 604	FLUAM (H5N1) MATRIX	48.529	25	1E-109	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 618	FLUAM (H5N1) MATRIX	75.758	66	2E-142	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 620	FLUAM (H5N1) MATRIX	10.775	21	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 621	FLUANA1 (H5N1)	54.564	43	1E-117	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.

9.3 Detección de la infección y/o coinfección de patógenos asociados a Influenza

Por medio del análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en el microarreglo RPM-Flu 3.1 se detectaron los patógenos asociados a enfermedades respiratorias en las 219 muestras analizadas. La tabla 11 muestra que de las 170 muestras positivas para influenza AH1N1 pdm 09 por el microarreglo RPM-FLU 3.1 101 presentaron coinfecciones con otros patógenos asociados a enfermedades respiratorias. Los resultados muestran que además de influenza se encontró la presencia de los géneros: *Streptococcus*

en 66 casos, *Pseudomonas* en 28 casos, *Haemophilus* en 51 casos, *Neisseria* en 26 casos, *Staphylococcus* en 13 casos, *Moraxella*, *Coronavirus*, *Mycoplasma* en 2 casos y *Klebsiella* en un caso. La tabla 11 muestra específicamente todos los patógenos identificados en cada una de las muestras. Los resultados también muestran el puntaje C3 el cual en la mayoría de las muestras correspondió a mayor a 20 indicando la presencia del patógeno mientras que en otras muestras el puntaje C3 dió entre 10 y 20 pero al observar el valor de expectativa en todas fue menor de 1e-10. Así mismo también se obtuvieron los LC-Len de todas las muestras que variaron desde 14 hasta 263. Todos los valores de Expectativa E fueron menores a 1e-10 lo cual corrobora la presencia de las secuencias nucleotídicas de las bacterias encontradas.

Tabla 11. Muestras positivas para influenza y patógenos asociados analizadas mediante el microarreglo RPM-Flu 3.1

Influenza (ID muestra)	Secuencia Identificada	P. C3	LC-Len	Valor E	Secuencia Comparada
372	FLUAM (H5N1) MATRIX	13.923	30	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINOMPP5	22.672	31	1E-34	Haemophilus influenzae DNA for P5 gene (strain A850048).
	PSAEGYRA	43.191	22	7E-37	Pseudomonas sp. URM017WK12:14 H042DRAFT_scaffold00001.1_C2, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	43.487	26	3E-93	Streptococcus pneumoniae TIGR4, complete genome.
Influenza 374	FLUAM (H1N1)	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	FLUANA1 (H5N1)	11.967	23	5E-57	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6
	STPNGYRA	38.312	53	5E-64	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	70.378	73	6E-138	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
Influenza 377	PSAEGYRA	32.685	78	2E-26	Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764 Contig_53, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	35.835	53	1E-138	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 379	FLUAHA3	11.856	20	6E-80	Influenza A virus (A/Boston/YGA_01074/2012(H3N2)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
	STAUGYRA	81.092	68	7E-162	Staphylococcus aureus UCIM6119 adppE-supercont1.1, whole genome shotgun sequence.

Influenza 379	STPNLYTA	81.12	55	3E-166	Staphylococcus aureus UCIM6119 adpPE-supercont1.1, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	80.882	91	3E-167	Streptococcus pneumoniae GA47179 GA47179.contig.10, whole genome shotgun sequence.
Influenza 380	HAINGYRA	61.618	26	5E-122	Haemophilus parainfluenzae HK2019 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	HAINOMPP ₅	45.547	110	1E-81	Haemophilus influenzae R2846, complete genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	20.339	25	1E-64	Influenza A virus (A/Illinois/02/2014(H1N1)) segment 7 matrix.
	FLUANA1 (H5N1)	10.628	28	1E-40	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	NEMEVIN	29.876	20	1E-51	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	93.067	246	8E-178	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	32.684	40	4E-63	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete.
Influenza 381	STPNGYRA	44.156	37	4E-79	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	35.835	53	1E-138	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 382	FLUAM (H5N1) MATRIX	15.617	22	2E-48	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-061/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	33.402	19	3E-73	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
	HAINOMPP ₅	14.575	19	3E-23	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	NEMEGYR _A	47.266	43	6E-107	Neisseria meningitidis alpha14 complete genome.
	NEMEVIN	29.876	16	2E-68	Neisseria meningitidis 2002038 NM2002038.contig.5, whole genome.
	STPNLYTP	25.63	19	3E-66	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	22.727	14	1E-40	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
Influenza 384	HAINGYRA	32.573	23	2E-53	Haemophilus parainfluenzae ATCC 33392 ctg1129647027313, whole.
	STPNGYRA	41.558	19	5E-87	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix.

Influenza 385	HAINGYRA	24.896	21	2E-38	Haemophilus parainfluenzae ATCC 33392 ctg1129647027313, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	10.775	21	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNGYRA	28.788	21	3E-51	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
Influenza 387	FLUAM (H5N1) MATRIX	15.617	22	2E-48	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-061/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNGYRA	51.082	28	4E-109	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete.
	STPNLYTP	21.008	18	1E-49	Streptococcus pneumoniae strain 01-4296 pneumolysin (ply) gene.
Influenza 388	AD2E1A	55.439	39	5E-152	Human adenovirus C strain human/RUS/16700/2001/57[P1H57F6],complete genome.
	AD2HEXON	27.571	29	1E-76	Human adenovirus type 1 subgroup C, complete genome.
	MYPNP65	99.37	263	0	Mycoplasma pneumoniae M129, complete genome.
	MYPNGYR A	98.305	152	0	M.pneumoniae (strain M129) gene for P65 protein.
	STPNLYTA	97.095	183	0	Streptococcus pneumoniae lytA gene for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, strain Tupelo.
	STPNLYTP	93.697	113	0	Streptococcus pneumoniae strain SC_2441 contig_43, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
Influenza 392	HAINOMPP 5	14.777	19	4E-21	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	NEMEVIN	47.095	27	2E-106	Neisseria meningitidis G2136 chromosome, complete genome.
	STPNGYRA	85.714	109	2E-164	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	STPNLYTP	59.244	47	2E-123	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	10.775	21	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 393	STPNGYRA	27.056	32	6E-49	Streptococcus mitis SK575 contig00022, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	92.133	89	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	NEMEVIN	23.859	22	2E-59	Neisseria meningitidis G2136 chromosome, complete genome.

Influenza 394	STPNLYTP	31.933	17	3E-69	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	15.368	37	3E-24	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	13.923	30	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 398	HAINOMPP 5	37.045	67	1E-67	Haemophilus parainfluenzae ATCC 33392 ctg1129647027313, whole genome shotgun sequence.
	HAINGYRA	18.465	20	6E-27	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	PSAEGYRA	32.296	20	3E-23	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14816 AZPAE14816_contig_69, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	11.138	19	4E-33	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 399	HAINOMPP 5	38.057	43	7E-61	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	77.234	93	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 400	HAINOMPP 5	19.838	16	4E-36	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	STPNGYRA	34.199	43	7E-58	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	10.775	21	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 402	HAINOMPP 5	29.15	37	8E-54	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	88.138	78	4E-33	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 404	HAINOMPP 5	45.749	82	6E-88	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	12.833	22	2E-32	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	NEMEVIN	19.71	21	5E-34	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
Influenza 405	HAINOMPP 5	54.251	84	6E-107	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	11.138	19	4E-33	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	17.842	17	9E-25	Haemophilus parainfluenzae HK2019 contig00001, whole genome shotgun sequence.

	NEMEGYR A	18.164	37	2E-33	Neisseria meningitidis NM36 gnm36.contig.64, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	91.387	160	0	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	50.216	24	4E-91	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 407	HAINOMPP 5	23.887	17	4E-47	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	NEMEGYR A	39.648	39	3E-88	Neisseria sp. GT4A_CT1 supercont1.2, whole genome shotgun sequence.
	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	NEMEVIN	22.614	34	1E-38	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
Influenza 408	HAINOMPP 5	13.765	13	7E-27	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	STPNGYRA	13.636	21	3E-20	Streptococcus mitis strain SK137 gsmSK137.contig.20_1, whole genome shotgun sequence.
	FLUANA1 (H5N1)	76.901	87	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 410	HAINOMPP 5	36.437	74	7E-67	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUANA1 (H5N1)	99.081	99	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	PSAEGYRA	26.459	24	9E-19	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14859 AZPAE14859_contig_23, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	42.857	48	1E-94	Streptococcus mitis strain R77 mitilysin gene, complete cds.
	STPNGYRA	28.788	32	3E-50	Streptococcus mitis 13/39 contig00006, whole genome shotgun sequence.
Influenza 412	HAINGYRA	24.896	21	2E-38	Haemophilus parainfluenzae ATCC 33392 ctg1129647027313, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	79.65	112	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNGYRA	28.788	21	3E-51	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	HAINOMPP 5	24.899	18	9E-39	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	STAUMECA	74.946	42	7E-154	Staphylococcus aureus VET0256R genomic scaffold adZEx-supercont1.28, whole genome shotgun sequence.

Influenza 415	STPNLYTP	85.924	111	4E-172	Streptococcus mitis strain 990123 mitilysin gene, complete cds.
	FLUANA1 (H5N1)	98.067	158	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	STPNGYRA	64.286	95	1E-120	Streptococcus mitis strain SK608 gsmSK608.contig. 8_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 418	STAUMECA	99.784	364	0	Staphylococcus aureus M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome
	FLUANA1 (H5N1)	78.63	48	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
Influenza 419	KLPNTOPO ISOMERASE	23.529	23	5E-33	Pseudomonas taiwanensis DSM 21245 H620DRAFT_scaffold00001.1_C2, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	19.011	19	3E-55	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	PSAEGYRA	32.685	19	7E-40	Pseudomonas fluorescens strain AU14705 Scaffold_480, whole genome shotgun sequence.
Influenza 420	STAUGYRA	61.765	24	1E-140	Staphylococcus aureus SJUD6040 adpoG-supercont1.4.C7, whole genome
	STPNLYTP	43.487	26	7E-92	Streptococcus mitis strain R77 mitilysin gene, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	70.011	69	3E-55	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 421	MYPNP65	98.529	158	0	M.pneumoniae (strain M129) gene for P65 protein.
	FLUAM (H1N1)	42.011	39	3E-55	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	MYPNGYRA	98.093	150	0	Mycoplasma pneumoniae 309 DNA, complete genome.
Influenza 424	HAINGYRA	69.917	48	4E-136	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	HAINOMPP5	26.721	18	4E-40	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	NEMEVIN	29.668	20	1E-66	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	91.011	87	3E-55	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	PSAEGYRA	21.401	18	0	Pseudomonas aeruginosa AES-1R contig00023, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	23.95	13	5E-56	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	19.264	15	8E-43	Streptococcus mitis SK575 contig00022, whole genome shotgun sequence.

Influenza 425	HAINOMPP 5	43.117	102	3E-77	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	NEMEVIN	18.88	20	6E-25	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	85.084	115	2E-168	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	FLUAM (H1N1)	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	STPNGYRA	43.29	21	2E-84	Streptococcus mitis B6 complete genome, strain B6.
Influenza 428	PSAEGYRA	42.802	39	2E-45	Pseudomonas sp. CHM02 contig00025, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	42.421	88	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
Influenza 430	STPNLYTP	55.672	29	5E-114	Streptococcus pneumoniae GA13637 GA13637.contig.14, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	83.021	84	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	STPNGYRA	35.931	31	1E-71	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
Influenza 431	HAINGYRA	41.909	27	1E-93	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
	FLUAM (H1N1)	91.001	77	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	HAINOMPP 5	24.899	55	9E-39	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	STPNGYRA	77.922	87	8E-139	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 432	STPNGYRA	54.978	32	2E-87	Streptococcus mitis 11/5 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	31.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNLYTA	24.274	21	6E-38	Streptococcus pneumoniae GA19101 GA19101.contig.14, whole genome shotgun sequence.
Influenza 434	FLUAM (H5N1) MATRIX	29.298	24	9E-110	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUAM (H3N2)	20.592	27	5E-65	Influenza A virus (A/Helsinki/1076/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	19.011	19	3E-55	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUANA1 (H5N1)	16.067	28	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.

	FLUANAS (H5N1)	13.798	26	2E-28	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-059/2014(H1N1)) nuclear export protein (NEP) and nonstructural protein 1 (NS1) genes, complete cds.
	STPNLYTP	90.336	129	3E-178	Streptococcus pneumoniae GA13637 GA13637.contig.14, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	80.303	49	2E-149	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 436	HAINGYRA	56.432	51	2E-118	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
	FLUAM (H1N1)	33.321	83	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	STPNGYRA	37.662	98	2E-118	Streptococcus mitis SK575 contig00022, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	86.975	21	3E-73	Streptococcus pseudopneumoniae SK674 ctg120004262778, whole genome shotgun sequence.
Influenza 437	PSAEGYRA	35.409	35	3E-30	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14912 AZPAE14912_contig_5, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	88.999	98	6E-12	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 439	HAINOMPP ₅	38.866	41	2E-68	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	HAINGYRA	18.88	18	1E-36	Haemophilus parainfluenzae HK2019 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	PSAEGYRA	70.428	52	2E-36	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14816 AZPAE14816_contig_69, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	33.421	27	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	STPNLYTP	73.95	74	1E-148	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	STPNGYRA	13.636	21	4E-21	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
Influenza 440	HAINOMPP ₅	68.623	75	4E-129	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	HAINGYRA	33.61	21	1E-69	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
	FLUAM (H1N1)	23.321	53	7E-86	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNLYTP	79.412	94	9E-159	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	73.593	53	2E-138	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	HAINGYRA	70.954	43	2E-125	Haemophilus influenzae 10810 genome.

Influenza 442	HAINOMPP 5	34.211	29	2E-52	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	NEMEGYR A	37.891	34	3E-89	Neisseria meningitidis strain 64 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	53.321	73	7E-86	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	NEMEVIN	36.722	19	6E-64	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	90.756	181	5E-176	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	STPNGYRA	77.489	58	6E-134	Streptococcus mitis strain SK608 gsmSK608.contig. 8_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 444	HAINGYRA	45.851	25	3E-93	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
	FLUAM (H1N1)	70.021	93	7E-86	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STAUGYRA	82.983	141	3E-166	Staphylococcus aureus UCIM6119 adppE-supercont1.1, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	75.42	60	3E-151	Streptococcus pneumoniae strain 81 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds.
Influenza 448	HAINGYRA	86.515	109	8E-174	Haemophilus influenzae R2846, complete genome.
	HAINOMPP 5	57.692	193	1E-112	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUANA1 (H5N1)	61.067	82	2E-80	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	STPNGYRA	30.952	38	6E-53	Streptococcus mitis strain SK608 gsmSK608.contig. 8_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 453	STAUGYRA	96.639	237	0	Staphylococcus aureus SJUD6040 adpoG-supercont1.4.C7, whole genome shotgun sequence.
	STAUMECA	92.657	120	0	Staphylococcus aureus M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	88.001	99	7E-86	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STAULUKS F-PV	76.559	64	1E-149	Staphylococcus aureus T62346 genomic scaffold adwrM-supercont1.7, whole genome shotgun sequence.
Influenza 455	FLUAM (H5N1) MATRIX	11.138	19	4E-33	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNLYTP	94.328	110	0	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.

	STPNGYRA	74.459	65	2E-133	Streptococcus mitis B6 complete genome, strain B6.
Influenza 461	FLUAM (H1N1)	55.031	80	2E-86	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
	HAINOMPP5	23.887	36	4E-55	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	PSAEGYRA	30.739	20	5E-30	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14859 AZPAE14859_contig_23, whole genome shotgun sequence.
Influenza 464	FLUAM (H5N1) MATRIX	77.051	60	1E-19	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	KLPNTOPO ISOMERASE	27.376	24	9E-35	Pseudomonas coronafaciens strain LMG 5060 contig00004, whole genome shotgun sequence.
	PSAEGYRA	43.969	31	2E-42	Pseudomonas fluorescens PA4C2 PA4C2_contig4, whole genome shotgun sequence.
Influenza 465	FLUAM (H5N1) MATRIX	82.132	49	3E-20	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	PSAEGYRA	57.588	28	2E-57	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14859 AZPAE14859_contig_23, whole genome shotgun sequence.
	STAUMECA	91.361	110	3E-178	Staphylococcus aureus VET0176R genomic scaffold adZIX-supercont1.26, whole genome shotgun sequence.
Influenza 471	FLUAM (H5N1) MATRIX	72.034	68	7E-22	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	25.726	32	1E-40	Haemophilus parainfluenzae HK2019 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	NEMEGYRA	47.07	33	5E-90	Neisseria sicca VK64 ctg120005024932, whole genome shotgun sequence.
	NEMEVIN	23.444	39	4E-41	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	17.857	10	1E-42	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
Influenza 473	FLUAM (H5N1) MATRIX	63.345	75	3E-21	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	24.481	23	1E-41	Haemophilus parainfluenzae HK2019 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	NEMEGYRA	51.758	41	1E-104	Neisseria sicca VK64 ctg120005024932, whole genome shotgun sequence.
	NEMEVIN	25.934	37	7E-49	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H3N2)	26.245	83	3E-14	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.

Influenza 476	PSAEGYRA	35.798	40	3E-28	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SS101 chromosome, whole genome shotgun sequence
	STPNLYTA	71.162	59	2E-150	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA19101 GA19101.contig.14, whole genome shotgun sequence
	STPNLYTP	50.63	27	1E-112	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA19101 GA19101.contig.14, whole genome shotgun sequence
Influenza 477	FLUANA1 (H5N1)	80.334	94	2E-80	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
	NEMEGYR A	14.844	35	7E-22	<i>Neisseria</i> sp. GT4A_CT1 supercont1.2, whole genome shotgun sequence.
	PSAEGYRA	31.907	37	6E-25	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> 14-3 substr. 14-3b strain 14-3 contig00027, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	18.615	20	2E-37	<i>Streptococcus mitis</i> 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
Influenza 478	FLUAM (H5N1) MATRIX	31.321	49	1E-33	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINOMPP 5	27.126	75	1E-47	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome
	PSAEGYRA	47.471	58	1E-45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AZPAE14728 AZPAE14728_contig_11, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	72.059	69	8E-147	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence
Influenza 481	FLUANA1 (H5N1)	23.561	38	0	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	STPNLYTA	53.942	18	1E-113	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA44386 GA44386.contig.9, whole genome
	STPNLYTP	34.454	13	5E-87	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA13637 GA13637.contig.14, whole genome shotgun sequence.
Influenza 482	FLUAM (H5N1) MATRIX	51.005	59	3E-51	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	NEMEGYR A	24.609	19	7E-57	<i>Neisseria</i> sp. GT4A_CT1 supercont1.2, whole genome shotgun sequence.
	NEMEVIN	22.199	23	2E-32	<i>Neisseria mucosa</i> strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	18.831	14	6E-30	<i>Streptococcus mitis</i> 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	32.684	40	4E-63	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINOMPP 5	38.057	100	8E-62	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome

Influenza 483	NEMEGYR A	38.867	27	7E-118	Neisseria sp. GT4A_CT1 supercont1.2, whole genome shotgun sequence.
	STAUGYRA	56.092	40	2E-118	Staphylococcus aureus M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	89.076	97	2E-176	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence
	STPNGYRA	67.749	36	6E-119	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 485	HAINGYRA	61.618	26	5E-122	Haemophilus parainfluenzae HK2019 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	HAINOMPP 5	45.547	110	1E-81	Haemophilus influenzae R2846, complete genome
	FLUAM (H5N1) MATRIX	20.339	25	1E-64	Influenza A virus (A/Illinois/02/2014(H1N1)) segment 7 matrix
	FLUANA1 (H5N1)	10.628	28	1E-40	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	NEMEVIN	29.876	20	1E-51	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	93.067	246	8E-178	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence
	STPNGYRA	32.684	40	4E-63	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete
Influenza 487	FLUANA1 (H5N1)	34.241	33	5E-46	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	HAINOMPP 5	59.109	40	1E-116	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	HAINGYRA	47.303	21	9E-93	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	STPNLYTP	80.462	130	1E-160	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence
	STPNGYRA	75.758	66	2E-142	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete
Influenza 489	FLUAM (H5N1) MATRIX	16.344	41	5E-46	Influenza A virus (A/Florida/17/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	PSAEGYRA	34.241	33	7E-28	Pseudomonas sp. PAMC 25886 ctg7180000004559, whole genome shotgun sequence.
Influenza 492	FLUANA1 (H5N1)	54.333	72	1E-51	Influenza A virus (A/Utah/03/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINOMPP 5	22.672	58	1E-39	Haemophilus influenzae R2846, complete genome
	STAUMECA	75.162	51	4E-152	Staphylococcus aureus VET0256R genomic scaffold

	STPNLYTP	89.706	98	3E-178	Streptococcus mitis strain 990123 mitilysin gene, complete cds.
	STPNGYRA	68.615	113	4E-121	Streptococcus mitis strain SK608 gsmSK608.contig. 8_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 496	FLUANA1 (H5N1)	89.099	99	3E-15	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
	HAINOMPP ₅	40.688	37	2E-79	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	PSAEGYRA	68.482	36	3E-65	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14859 AZPAE14859_contig_23, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	52.311	35	6E-111	Streptococcus pneumoniae strain 2055 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds.
Influenza 497	FLUAM (H5N1) MATRIX	91.807	151	0	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	28.088	22	3E-58	Haemophilus pittmaniae HK 85 ctg1129913985442, whole genome shotgun sequence.
	NEMEVIN	22.407	28	3E-38	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun
	NEMEGYR _A	20.898	15	2E-49	Neisseria meningitidis strain 59 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, complete cds.
	STPNLYTP	77.521	99	3E-155	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	STPNGYRA	54.978	56	3E-101	Streptococcus mitis SK575 contig00022, whole genome shotgun sequence.
Influenza 500	FLUAM (H5N1) MATRIX	20.469	34	3E-79	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	KLPNMDH	48.529	25	1E-109	Klebsiella pneumoniae UCI 41 adjcP-supercont1.1.C8, whole genome shotgun sequence
	PSAEGYRA	49.027	39	6E-52	Pseudomonas otitidis strain LNU-E-001 contig_73, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	66.597	61	1E-132	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	STPNGYRA	15.801	20	2E-29	Streptococcus mitis strain SK578 gsmSK578.contig. 12_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 503	FLUAM (H5N1) MATRIX	49.595	94	5E-96	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINOMPP ₅	39.069	46	2E-72	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	HAINGYRA	22.822	14	3E-61	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome

	KLPNTOPO ISOMERAS E	18.552	11	7E-23	Pseudomonas putida HB3267, complete genome
	PSAEGYRA	39.3	18	3E-44	Pseudomonas sp. LAMO17WK12:12 D883DRAFT_scaffold00003.3_C, whole genome shotgun sequence.
Influenza 504	FLUAHA3	13.856	23	6E-80	Influenza A virus (A/Boston/ YGA_01074/2012(H3N2)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
	STAUGYRA	81.092	68	7E-162	Staphylococcus aureus UCIM6119 adppE- supercont1.1, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTA	81.12	55	3E-166	Staphylococcus aureus UCIM6119 adppE- supercont1.1, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	80.882	91	3E-167	Streptococcus pneumoniae GA47179 GA47179.contig.10, whole genome shotgun sequence
Influenza 507	FLUAM (H1N1)	56.017	33	2E-114	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINOMPP 5	11.943	8	2E-22	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	PSAEGYRA	35.019	45	8E-25	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14859 AZPAE14859_contig_23, whole genome shotgun sequence.
	STAUGYRA	35.924	23	7E-92	Staphylococcus aureus M1413 adtCH- supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	65.584	53	2E-118	Streptococcus mitis 13/39 contig00006, whole genome shotgun sequence.
Influenza 510	FLUAM (H1N1)	39.069	46	2E-72	Influenza A virus (A/Massachusetts/15/2013(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	56.017	33	2E-114	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
	HAINOMPP 5	46.356	50	8E-89	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	NEMEVIN	34.647	19	7E-77	Neisseria meningitidis G2136 chromosome, complete genome.
	STPNLYTP	80.042	101	2E-162	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	STPNGYRA	30.519	24	8E-58	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
Influenza 514	FLUAHA3	35.019	45	8E-25	Influenza A virus (A/Boston/ YGA_01074/2012(H3N2)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
	HAINGYRA	22.614	15	3E-50	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
Influenza 515	FLUAHA3	87.605	75	3E-120	Influenza A virus (A/Boston/ YGA_01074/2012(H3N2)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds.

	PSAEGYRA	21.401	12	2E-16	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> strain KL28, complete genome.
Influenza 516	FLUAM (H1N1)	82.353	68	4E-171	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	NEMEVIN	53.734	41	2E-110	<i>Neisseria meningitidis</i> strain 4 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene complete cds.
	NEMEGYR A	40.234	36	1E-89	<i>Neisseria meningitidis</i> G2136 chromosome, complete genome.
	STPNLYTP	44.328	30	5E-95	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	35.281	30	5E-60	<i>Streptococcus mitis</i> strain SK608 gsmSK608.contig. 8_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 520	FLUAM (H5N1) MATRIX	57.456	39	3E-50	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNLYTA	92.739	138	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA19101 GA19101.contig.14, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	87.605	63	5E-176	<i>Streptococcus pneumoniae</i> MNZ37 genomic scaffold MNZ37_Scaffold54, whole genome shotgun sequence.
Influenza 534	FLUANA1 (H5N1)	63.025	33	2E-80	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
	NEMEVIN	16.598	29	4E-24	<i>Neisseria mucosa</i> strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STAUGYRA	15.756	20	6E-34	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	28.571	33	1E-48	<i>Streptococcus mitis</i> SK575 contig00022, whole genome shotgun sequence.
Influenza 542	FLUAM (H5N1) MATRIX	78.04	64	3E-82	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	PSAEGYRA	40.078	64	4E-38	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PA4C2 PA4C2_contig4, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	25.974	19	4E-52	<i>Streptococcus mitis</i> SK575 contig00022, whole genome shotgun sequence.
Influenza 543	FLUAM (H5N1) MATRIX	34.14	55	5E-127	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNLYTP	57.563	42	3E-120	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
Influenza 547	FLUAM (H5N1) MATRIX	19.236	22	1E-71	Influenza A virus (A/Nicaragua/4444_04/2013(H1N1)) matrix protein 2.
	PSAEGYRA	22.568	25	3E-17	<i>Pseudomonas</i> sp. CFII64 soap_scaffs_II64_half.Contig2, whole genome shotgun sequence.

	STPNLYTA	81.743	67	2E-172	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA19101 GA19101.contig.14, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	63.025	33	2E-137	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 81 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds.
Influenza 550	FLUAM (H5N1) MATRIX	16.611	19	2E-76	Influenza A virus (A/Illinois/02/2014(H1N1)) segment 7 matrix.
	STAUMECA	30.67	28	2E-73	<i>Staphylococcus aureus</i> W70590 genomic scaffold adHtd-supercont1.1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 554	FLUAM (H5N1) MATRIX	34.14	55	5E-127	Influenza A virus (A/Missouri/NHRC419710/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	23.067	23	2E-74	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUAM (H3N2)	19.236	22	1E-71	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-13-008/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUANA1 (H5N1)	14.31	27	8E-69	Influenza A virus (A/Utah/03/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUANS (H5N1)	12.945	27	1E-27	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-059/2014(H1N1)) nuclear export protein (NEP) and nonstructural protein 1 (NS1) genes, complete cds.
	MOCACOP B	41.807	32	5E-79	<i>Moraxella catarrhalis</i> outer membrane protein B2 (copB) gene, partial cds.
Influenza 555	FLUAM (H5N1) MATRIX	26.029	53	2E-93	Influenza A virus (A/Missouri/NHRC419710/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	FLUAM (H1N1)	12.294	14	1E-37	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	FLUANS (H5N1)	12.233	26	5E-26	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-059/2014(H1N1)) nuclear export protein (NEP) and nonstructural protein 1 (NS1) genes, complete cds.
	FLUANA1 (H5N1)	10.46	23	3E-36	Influenza A virus (A/Utah/03/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	MOCACOP B	35.084	30	3E-62	<i>Moraxella catarrhalis</i> outer membrane protein B2 (copB) gene, partial cds.
Influenza 567	FLUANA1 (H5N1)	36.093	50	2E-53	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
	STPNLYTA	82.353	65	3E-170	<i>Streptococcus pneumoniae</i> lytA gene for peptidoglycan hydrolytic amidase, strain 949.
	STPNLYTP	34.025	17	2E-91	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA19101 GA19101.contig.14, whole genome shotgun sequence.

Influenza 568	FLUAM (H5N1) MATRIX	92.133	89	7E-45	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	20.332	18	1E-43	Haemophilus influenzae R2846, complete genome.
	NEMEVIN	22.822	31	2E-32	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
Influenza 569	FLUAM (H5N1) MATRIX	89.999	101	7E-45	Influenza A virus (A/New York/WC-LVD-14-042/2014(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	PSAEGYRA	33.463	38	3E-33	Pseudomonas fluorescens strain AU14705 Scaffold_480, whole genome shotgun sequence.
Influenza 586	FLUAM (H5N1) MATRIX	32.684	18	3E-65	Influenza A virus (A/Nicaragua/4444_04/2013(H1N1)) matrix protein 2.
	PSAEGYRA	44.358	28	7E-33	Pseudomonas sp. R62 contig00022, whole genome shotgun sequence.
Influenza 587	FLUAM (H5N1) MATRIX	75	95	9E-31	Influenza A virus (A/Illinois/02/2014(H1N1)) segment 7 matrix.
	PSAEGYRA	24.514	19	2E-15	Pseudomonas syringae strain mixed scf_4502_2998_contig_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 589	FLUANA1 (H5N1)	43.191	22	7E-37	Influenza A virus (A/Utah/03/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	64.315	33	2E-133	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
	HAINOMPP5	56.478	47	2E-111	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	PSAEGYRA	34.241	12	0	Pseudomonas sp. R62 contig00022, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	91.126	146	8E-174	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	STPNLYTP	26.471	24	3E-74	Streptococcus pneumoniae strain 81 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds.
Influenza 590	FLUANA1 (H5N1)	87.967	78	0	Influenza A virus (A/Ft Carson/WR1446P/2009(H1N1)) segment 6 sequence.
	PSAEGYRA	53.307	29	5E-53	Pseudomonas aeruginosa strain AZPAE14912 AZPAE14912_contig_5, whole genome shotgun sequence.
Influenza 591	FLUANA1 (H5N1)	20.339	25	1E-64	Influenza A virus (A/New Jersey/NHRC403730/2013(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	STPNLYTA	46.266	20	5E-110	Streptococcus pneumoniae 459-5 spn4595F.contig.32, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	28.992	16	5E-75	Streptococcus pneumoniae GA13637 GA13637.contig.14, whole genome shotgun sequence.

Influenza 592	FLUANA1 (H5N1)	79.046	70	7E-158	Influenza A virus (A/North Carolina/09/2013(H1N1)) segment 6.
	HAINOMPP 5	42.308	105	5E-79	Haemophilus influenzae R2846, complete genome.
	HAINGYRA	18.672	20	2E-37	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome.
Influenza 596	AD2E1A	55.439	39	5E-152	Human adenovirus C strain human/RUS/16700/2001/57[P1H57F6], complete genome.
	AD2HEXON	27.571	29	1E-76	Human adenovirus type 1 subgroup C, complete genome.
	STPNLYTA	97.095	183	0	Streptococcus pneumoniae lytA gene for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, strain Tupelo.
	STPNLYTP	93.697	113	0	Streptococcus pneumoniae strain SC_2441 contig_43, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H1N1)	12.421	14	3E-32	Influenza A virus (A/North Carolina/01/2014(H1N1)) segment 7 matrix
Influenza 600	STPNGYRA	85.714	109	2E-164	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	STPNLYTP	59.244	47	2E-123	Streptococcus mitis strain R75II mitilysin gene, partial cds.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	73.95	74	1E-148	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 601	STPNGYRA	27.056	32	6E-49	Streptococcus mitis SK575 contig00022, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	13.923	30	7E-45	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 602	NEMEVIN	23.859	22	2E-59	Neisseria meningitidis G2136 chromosome, complete genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	40.078	64	4E-38	Influenza A virus (A/Santa Clara/YGA_03065/2013(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 605	HAINOMPP 5	37.045	67	1E-67	Haemophilus parainfluenzae ATCC 33392 ctg1129647027313, whole genome shotgun sequence.
	HAINGYRA	18.465	20	6E-27	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	54.564	43	1E-117	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 606	HAINOMPP 5	38.057	43	7E-61	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	51.005	59	3E-51	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINOMPP 5	19.838	16	4E-36	Haemophilus influenzae 10810 genome.

Influenza 607	STPNGYRA	34.199	43	7E-58	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	87.067	98	3E-20	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 609	HAINOMPP ₅	29.15	37	8E-54	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	11.138	19	4E-33	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
Influenza 611	HAINOMPP ₅	45.749	82	6E-88	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	12.833	22	2E-32	Influenza A virus (A/Kaliningrad/RII4/2011(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	STPNGYRA	89.099	99	3E-15	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	NEMEVIN	19.71	21	5E-34	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
Influenza 612	HAINOMPP ₅	54.251	84	6E-107	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	51.758	41	1E-104	Influenza A virus (A/California/09/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	HAINGYRA	17.842	17	9E-25	Haemophilus parainfluenzae HK2019 contig00001, whole genome shotgun sequence.
	NEMEGYR _A	18.164	37	2E-33	Neisseria meningitidis NM36 gnm36.contig.64, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	91.387	160	0	Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	50.216	24	4E-91	Streptococcus pneumoniae strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 614	NEMEGYR _A	39.648	39	3E-88	Neisseria sp. GT4A_CT1 supercont1.2, whole genome shotgun sequence.
	FLUANA1 (H5N1)	57.563	42	3E-120	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	NEMEVIN	22.614	34	1E-38	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
Influenza 615	HAINOMPP ₅	13.765	13	7E-27	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	STPNGYRA	13.636	21	3E-20	Streptococcus mitis strain SK137 gsmSK137.contig.20_1, whole genome shotgun sequence.
	FLUANA1 (H5N1)	23.561	38	0	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.

Influenza 617	HAINOMPP 5	36.437	74	7E-67	Haemophilus influenzae 10810 genome.
	FLUANA1 (H5N1)	40.688	37	2E-79	Influenza A virus (A/Maryland/09/2014(H1N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds.
	STPNLYTP	42.857	48	1E-94	Streptococcus mitis strain R77 mitilysin gene, complete cds.
	STPNGYRA	28.788	32	3E-50	Streptococcus mitis 13/39 contig00006, whole genome shotgun sequence.
Influenza 619	HAINGYRA	24.896	21	2E-38	Haemophilus parainfluenzae ATCC 33392 ctg1129647027313, whole genome shotgun sequence.
	FLUAM (H5N1) MATRIX	10.775	21	9E-31	Influenza A virus (A/Helsinki/383N/2014(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds.
	NEMEVIN	22.614	34	1E-38	Neisseria mucosa strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	28.788	21	3E-51	Streptococcus mitis 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.

9.4 Correlación del virus de la influenza y otros patógenos asociados con enfermedades respiratorias mediante el microarreglo RPM

Distribución del virus de la influenza y otros patógenos asociados con enfermedades respiratorias

De las 219 muestras analizadas, 170 fueron confirmadas con Influenza AH1N1 (78%) y 49 muestras no fueron detectadas como Influenza con el microarreglo RPM Flu 3.1 (22%). De las 170 muestras con presencia de Influenza se presentaron uno o más patógenos asociados a enfermedades respiratorias en el 59% de las muestras con Influenza AH1N1 pandémica, mientras que 41% de las muestras no mostraron patógenos asociados. Por otro lado, en ausencia de Influenza se presentaron uno o más patógenos asociados en el 17%, mientras que 5% no presentaron patógenos (Figura 7).

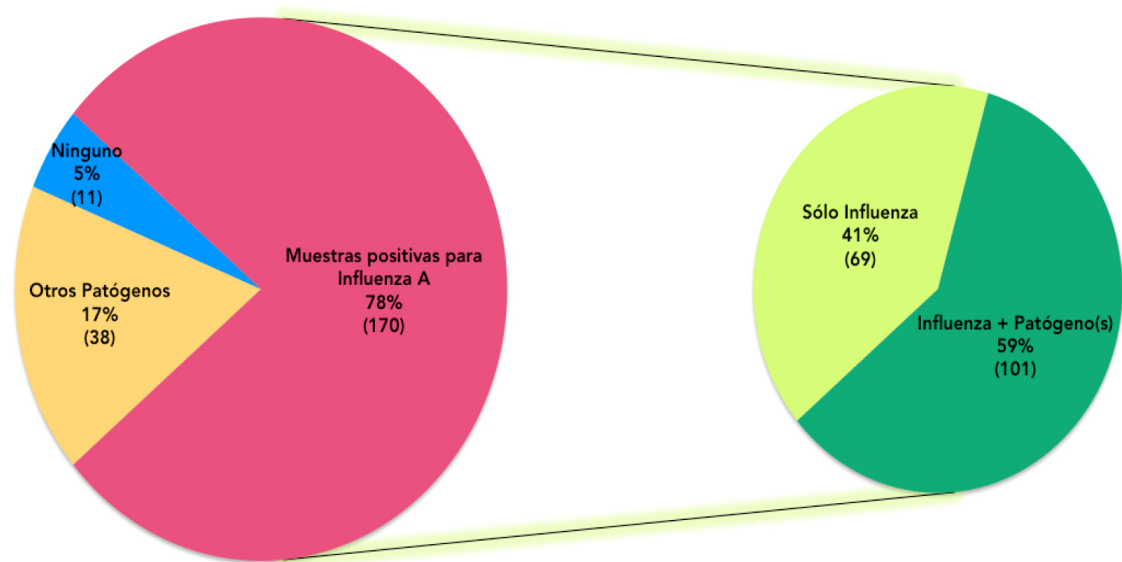


Figura 7. Porcentaje de virus de la influenza y otros patógenos asociados con enfermedades respiratorias en las muestras analizadas. De las 219 muestras analizadas, 170 fueron positivas para influenza AH1N1 pandémica (78%) mientras que 17% fueron positivas para patógenos diversos y el 5% fueron negativas para influenza o patógenos a su vez. De las 170 muestras con Influenza AH1N1 pandémica un 59% presentaron asociadas a patógenos y 41% fueron positivas únicamente para influenza AH1N1 pandémica.

Influenza AH1N1 pandémica asociada al número de patógenos

En la figura 8 se muestra que de las 219 muestras analizadas, 101 muestras que son positivas para influenza AH1N1 pandémica están asociadas a uno o más patógeno(s) detectados con el microarreglo RPM-Flu 3.1. El mayor porcentaje de las muestras con influenza AH1N1 (23%) se encontraron asociadas a un solo patógeno, seguido por las muestras positivas asociadas a dos patógenos con el 19%, así como las muestras positivas asociadas a tres patógenos que representan el 15% y por último las menos frecuentes fueron las muestras positivas asociadas a cuatro patógenos que pertenecen al 2%. Así mismo, las 38 muestras identificadas por el microarreglo como negativas para influenza en algunos casos se presentaron asociadas a uno o más patógeno(s). Por otro lado, se detectaron 9 muestras negativas para influenza AH1N1 pandémica y que a su vez no presentaban ningún patógeno, lo que corresponde al 5% de las muestras negativas.

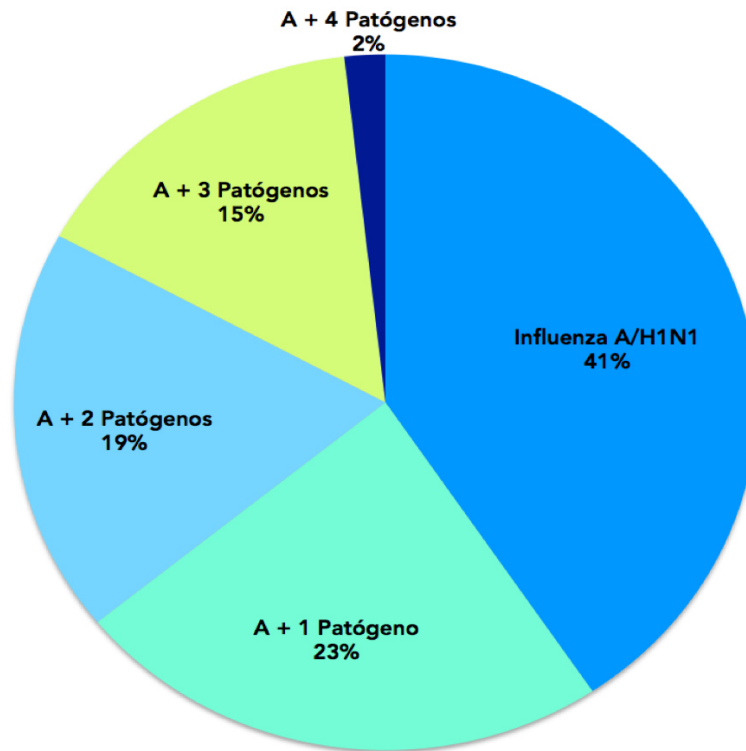


Figura 8. Distribución de patógenos asociados en las muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica. Las muestras de Influenza AH1N1 asociadas a un solo patógeno corresponden al 23%, mientras que las muestras asociadas a 2 patógenos corresponden al 19%, las asociadas a 3 patógenos corresponden al 15% y las asociadas a 4 patógenos corresponden al 2%.

También se realizó un análisis de asociación entre los patógenos encontrados por el microarreglo RPM-Flu 3.1 tomando en cuenta las 170 muestras positivas. La figura 9 muestra que los patógenos que presentaron mayor frecuencia con influenza correspondieron a *Streptococcus* en 66 casos (34%), *Haemophilus* en 51 casos (26%), *Pseudomonas* en 28 casos (15%), *Neisseria* en 26 casos (13%) y *Staphylococcus* en 13 casos (7%).

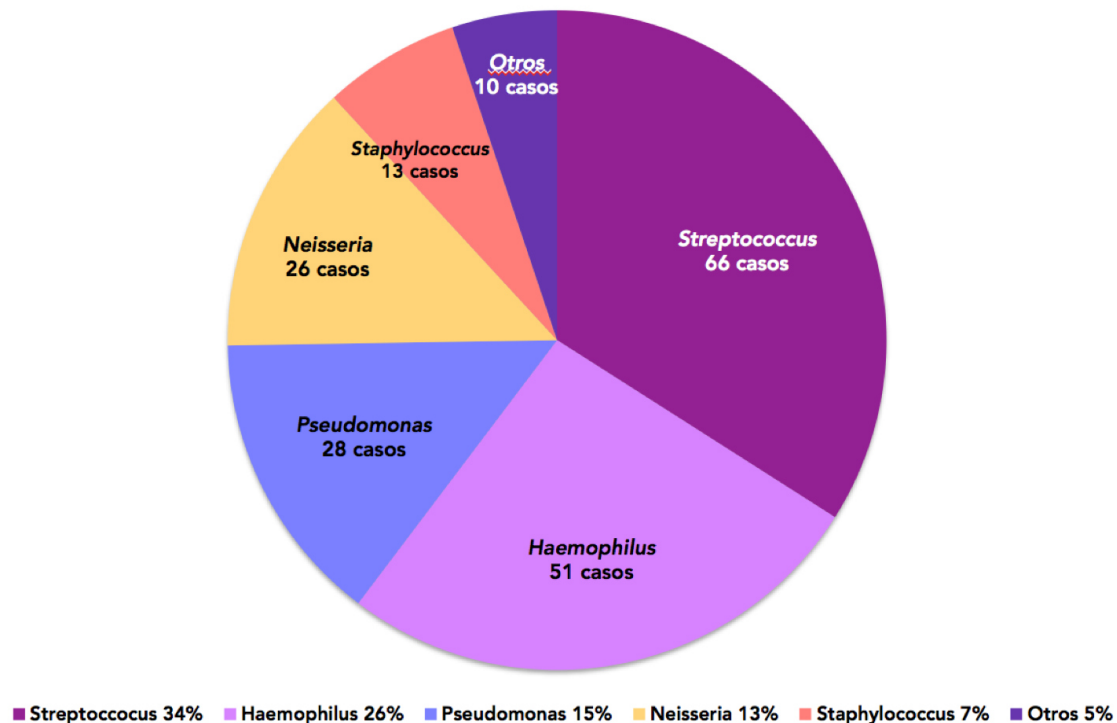


Figura 9. Distribución de patógenos en muestras positivas de influenza A/H1N1 en las muestras analizadas mediante el microarreglo RPM-Flu 3.1. El diagrama muestra el porcentaje y número de casos de patógenos encontrados en las muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica. El mayor porcentaje de las muestras de influenza correspondieron a *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Pseudomonas*.

Detección de patógenos identificados en muestras negativas para Influenza

La tabla 12 muestra que de las 49 muestras negativas para influenza AH1N1 pandémica por el microarreglo RPM-FLU 3.1, en 38 casos se detectaron otros patógenos mientras que en 11 muestras no se detectó ningún tipo de patógeno. Se encontró la presencia del género *Streptococcus* en 16 casos, *Pseudomonas* en 16 casos, *Haemophilus* en 15 casos, *Staphylococcus* en 8 casos y *Moraxella*, *Adenovirus* y *Herpesvirus* en un caso. Se obtuvo el puntaje C3 el cual en la mayoría de las muestras dió mayor a 20 indicando la presencia del patógeno. Así mismo, también se obtuvieron los LC-Len de todas las muestras que varían desde 10 hasta 272. Todos los valores de Expectativa E fueron menores a $1e-10$ lo cual corrobora la presencia de las secuencias nucleotídicas de las bacterias encontradas.

Tabla 12. Muestras negativas para influenza AH1N1 pandémica analizadas mediante el microarreglo RPM-Flu 3.1

Influenza (ID muestra)	Secuencia Identificada	P. C3	LC-Len	Valor E	Secuencia Comparada
Influenza 378	STAUMECA	96.76	158	0	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
Influenza 395	HAINGYRA	79.046	70	7E-158	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	HAINOMPP5	37.045	42	2E-56	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	NEMEVIN	37.967	40	9E-62	<i>Neisseria mucosa</i> strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	PSAEGYRA	50.973	26	3E-51	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AZPAE14816 AZPAE14816_contig_69, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	16.017	12	3E-31	<i>Streptococcus mitis</i> 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
Influenza 401	HAINOMPP5	17.814	25	3E-35	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	NEMEVIN	34.647	23	2E-75	<i>Neisseria meningitidis</i> G2136 chromosome, complete genome.
Influenza 403	HAINOMPP5	18.219	15	2E-34	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
Influenza 406	HAINOMPP5	23.279	18	6E-42	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
Influenza 409	HAINOMPP5	23.887	18	2E-51	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	STPNLYTP	75	46	4E-152	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2055 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds.
	STPNGYRA	22.294	12	7E-57	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 416	PSAEGYRA	24.125	18	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AZPAE14859 AZPAE14859_contig_23, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	77.922	38	2E-137	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 422	PSAEGYRA	22.568	13	2E-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AES-1R contig00023, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	52.381	51	9E-97	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	STPNLYTP	49.79	31	1E-105	<i>Streptococcus mitis</i> strain 990123 mitilysin gene, complete cds.
	NEMEVIN	23.651	22	1E-47	<i>Neisseria meningitidis</i> 8013, complete genome.

Influenza 427	STPNLYTP	16.807	10	3E-50	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	12.554	13	7E-42	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 429	PSAEGYRA	26.459	15	3E-15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AZPAE14908 AZPAE14908_contig_50, whole genome shotgun sequence.
Influenza 433	PSAEGYRA	35.409	26	9E-41	<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 25886 ctg7180000004559, whole genome shotgun sequence.
Influenza 445	HAINOMPP5	24.494	42	2E-35	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	PSAEGYRA	66.148	55	1E-61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BWHPA044 adkFY-supercont1.1.C2, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	32.684	18	3E-65	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 446	HAINGYRA	79.461	120	7E-162	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome.
	HAINOMPP5	60.121	211	3E-116	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	STPNGYRA	19.481	15	1E-32	<i>Streptococcus mitis</i> strain SK608 gsmSK608.contig.8_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 449	HAINGYRA	86.515	109	8E-174	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome.
	HAINOMPP5	57.692	193	1E-112	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	STPNGYRA	30.952	38	6E-53	<i>Streptococcus mitis</i> strain SK608 gsmSK608.contig.8_1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 452	PSAEGYRA	37.743	50	2E-29	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp, complete genome.
Influenza 458	HAINGYRA	38.174	28	8E-81	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome.
	STAUGYRA	87.815	75	1E-175	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	67.017	58	7E-139	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA13637 GA13637.contig.14, whole genome shotgun sequence.
Influenza 466	STAUGYRA	97.269	272	0	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	27.311	11	7E-58	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds.
Influenza 470	STAUMECA	95.248	133	0	<i>Staphylococcus aureus</i> VET0176R genomic scaffold adZIX-supercont1.26, whole genome shotgun sequence.
Influenza 475	PSAEGYRA	30.739	20	7E-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AES-1R contig00023, whole genome shotgun sequence.

Influenza 479	KLPNTOPOISOMERASE	26.923	21	9E-35	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NZ052 contig00019_contig_1, whole genome shotgun sequence.
	PSAEGYRA	43.969	17	5E-50	<i>Pseudomonas</i> sp. LAMO17WK12:I2 D883DRAFT_scaffold00003.3_C, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	68.697	72	4E-137	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence
Influenza 480	STAUMECA	97.84	124	0	<i>Staphylococcus aureus</i> W70590 genomic scaffold adHtd-supercont1.1,
Influenza 486	PSAEGYRA	30.35	18	4E-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AZPAE14816 AZPAE14816_contig_69, whole genome shotgun sequence.
Influenza 498	PSAEGYRA	21.79	19	2E-15	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> strain PA1G7 genomic scaffold Scaffold1, whole genome shotgun sequence.
Influenza 501	AD7E1A	89.083	121	6E-169	Human adenovirus 66 strain 87-922, complete genome.
	STPNLYTP	91.807	151	0	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ATCC BAA-960 contig00042, whole genome shotgun sequence
	STPNGYRA	73.16	65	9E-128	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
Influenza 505	HAINGYRA	54.564	43	1E-117	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome
	HAINOMPP5	49.595	94	5E-96	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
Influenza 509	PSAEGYRA	29.183	30	8E-24	<i>Pseudomonas putida</i> S12, complete genome
Influenza 513	STPNGYRA	16.45	12	4E-43	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.
	STPNLYTA	15.768	14	3E-28	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GA44386 GA44386.contig.9, whole genome shotgun sequence.
Influenza 521	STAUGYRA	82.353	68	4E-171	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	STAUMECA	57.451	30	3E-120	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
Influenza 546	STAUMECA	89.201	114	4E-175	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
Influenza 549	PSAEGYRA	40.467	33	6E-34	<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 25886 ctg7180000004559, whole genome shotgun sequence.
Influenza 553	STAUGYRA	29.832	15	2E-76	<i>Staphylococcus aureus</i> M1413 adtCH-supercont1.6.C6, whole genome shotgun sequence.
	STAUMECA	17.711	16	4E-40	<i>Staphylococcus aureus</i> W70590 genomic scaffold adHtd-supercont1.1, whole genome shotgun sequence.
	HUCYDNAPOL	48.95	44	5E-110	Human herpesvirus 5 isolate Nantes 13445 DNA polymerase (UL54) gene, partial cds.

Influenza 566	PSAEGYRA	33.463	31	4E-39	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AZPAE14908 AZPAE14908_contig_50, whole genome shotgun sequence
Influenza 575	MOCAUSPA1	40.211	57	7E-81	<i>Moraxella catarrhalis</i> strain P44 UspA1 (uspA1) gene, complete cds.
Influenza 583	STPNLYTA	87.967	78	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 459-5 spn4595F.contig.32, whole genome shotgun sequence.
	STPNLYTP	78.571	74	3E-158	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2055 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds.
Influenza 603	HAINGYRA	79.046	70	7E-158	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	HAINOMPP5	37.045	42	2E-56	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	NEMEVIN	37.967	40	9E-62	<i>Neisseria mucosa</i> strain C6A contig_10, whole genome shotgun sequence.
	PSAEGYRA	50.973	26	3E-51	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AZPAE14816 AZPAE14816_contig_69, whole genome shotgun sequence.
	STPNGYRA	16.017	12	3E-31	<i>Streptococcus mitis</i> 18/56 contig00001, whole genome shotgun sequence.
Influenza 608	HAINOMPP5	17.814	25	3E-35	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	NEMEVIN	34.647	23	2E-75	<i>Neisseria meningitidis</i> G2136 chromosome, complete genome.
Influenza 610	HAINOMPP5	18.219	15	2E-34	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
Influenza 613	HAINOMPP5	23.279	18	6E-42	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
Influenza 616	HAINOMPP5	23.887	18	2E-51	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome.
	STPNLYTP	75	46	4E-152	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2055 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds.
	STPNGYRA	22.294	12	7E-57	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds.

9.5 Análisis de Influenza AH1N1 y patógenos asociados

Adicionalmente, se determinaron los porcentajes de frecuencia entre los patógenos encontrados por el Microarreglo RPM-Flu 3.1 tomando en cuenta las 208 muestras positivas para al menos un patógeno. La tabla 13 muestra los patógenos identificados y su porcentaje del total de las muestras. Los patógenos encontrados en las muestras analizadas del Noreste de México correspondieron al género *Streptococcus* en 82 casos (37.44%), *Haemophilus* en 66 casos

(30.13%), *Pseudomonas* en 44 casos (20.09%), *Neisseria* en 31 casos (14.15 %), *Staphylococcus* en 21 casos (9.6%), *Moraxella* y *Adenovirus* en 3 casos (1.37% respectivamente), *Mycoplasma* en 2 casos (0.91%), *Herpesvirus* y *Klebsiella* en 1 caso (0.45% respectivamente).

Tabla 13. Correlación de Influenza AH1N1 pandémica con patógenos asociados a enfermedades respiratorias

Patógeno	Influenza A/H1N1 (positivas)	Influenza A/H1N1 (negativas)	Total # N=219
<i>Streptococcus</i>	66 (34%)	16 (32.65%)	82 (37.44%)
<i>Haemophilus</i>	51 (26%)	15 (30.61%)	66 (30.13%)
<i>Pseudomonas</i>	28 (15%)	16 (32.65%)	44 (20.09%)
<i>Neisseria</i>	26 (13%)	5 (10.20%)	31 (14.15%)
<i>Staphylococcus</i>	13 (7%)	8 (16.32%)	21 (9.6%)
<i>Moraxella</i>	2 (1.17%)	1 (2.04%)	3 (1.37%)
<i>Adenovirus</i>	2 (1.17%)	1 (2.04%)	3 (1.37%)
<i>Mycoplasma</i>	2 (1.17%)	-	2 (0.91%)
<i>Herpesvirus</i>	-	1 (2.04%)	1 (0.45%)
<i>Klebsiella</i>	1 (0.58%)	-	1 (0.45%)

Total de casos positivos: 170 Total de casos negativos: 49

Para analizar la correlación de los patógenos con el virus de la influenza se realizó un análisis estadístico de correlación de Phi como lo muestra la Tabla 14. Se observa la distribución de todos los patógenos encontrados por el microarreglo RPM-Flu 3.1 en las 170 muestras en los casos positivos y negativos de Influenza AH1N1 pandémica. Los resultados del análisis de correlación, muestra que los patógenos que presentaron mayor correlación positiva con la prueba Phi con los casos positivos de influenza AH1N1 pandémica fueron *Streptococcus* (0.724),

Haemophilus (0.520) y *Neisseria* (0.572). Sorprendentemente, el género *Neisseria* mostró una correlación positiva con el virus de influenza AH1N1 pandémica (0.572) con la correlación de Phi mientras que los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, no mostraron correlación significativa con valores de 0.168 y 0.182 respectivamente.

Tabla 14. Análisis de correlación de las muestras positivas para Influenza AH1N1 pandémica asociadas a patógenos

Patógeno	Influenza A/H1N1 (positivas)	Influenza A/H1N1 (negativas)	Total # N=219	Prueba Phi ²	Prueba Pearson
<i>Streptococcus</i>	66 (34%)	16 (32.65%)	82 (37.44%)	0.724	0.231
<i>Haemophilus</i>	51 (26%)	15 (30.61%)	66 (30.13%)	0.520	0.108
<i>Pseudomonas</i>	28 (15%)	16 (32.65%)	44 (20.09%)	0.168	-0.104
<i>Neisseria</i>	26 (13%)	5 (10.20%)	31 (14.15%)	0.572	0.140
<i>Staphylococcus</i>	13 (7%)	8 (16.32%)	21 (9.6%)	0.182	-0.096
<i>Moraxella</i>	2 (1.17%)	1 (2.04%)	3 (1.37%)	0.311	-0.018
<i>Adenovirus</i>	2 (1.17%)	1 (2.04%)	3 (1.37%)	0.311	-0.018
<i>Mycoplasma</i>	2 (1.17%)	-	2 (0.91%)	0.465	0.075
<i>Herpesvirus</i>	-	1 (2.04%)	1 (0.45%)	0.115	-.136
<i>Klebsiella</i>	1 (0.58%)	-	1 (0.45%)	0.428	0.053

10. DISCUSIÓN

El virus de influenza es responsable de morbilidad y mortalidad significativa con un serio impacto social y económico en todo el mundo. Cada año el virus de influenza A causa de tres a cinco millones de infecciones graves en humanos y 0.25-0.5 millones de personas mueren por gripe en todo el mundo. Los principales factores que hacen tan peligroso al virus de la influenza A son su elevada tasa de mutación generando epidemias de influenza anuales y la redistribución de los segmentos en la co-infección de diferentes virus de influenza A en una misma célula que conducen a una nueva cepa que es capaz de ocasionar una pandemia. Es por esto que en esta tesis establecimos un programa de vigilancia epidemiológico capaz de detectar los tipos y subtipos del virus de influenza en la población del estado de Nuevo León. Para ello, se seleccionó la plataforma de microarreglos RPM-Flu 3.1 que demostró ser capaz de identificar los diferentes tipos y subtipos del virus de influenza así como su coinfección con patógenos asociados a enfermedades respiratorias de una forma rápida, simultánea y eficaz.

En un estudio previo en el laboratorio, Willis en el 2012 llevó a cabo la validación del microarreglo RPM-Flu 3.1 aislando los ácidos nucleicos de las muestras e identificando las secuencias presentes en vacunas como Fluzone, Fluarix y controles positivos proporcionados por la SSA del Estado de Nuevo León así como una muestra positiva proporcionada por la compañía TessArae. Los resultados detectaron las secuencias específicas de cada subtipo del virus de influenza A y B que hibridaron a sus complementarias en el microarreglo RPM-Flu 3.1 permitiendo la correcta identificación del tipo y subtipo del virus de influenza.

Para la vigilancia epidemiológica del brote del año 2014 se obtuvieron 219 muestras de exudados faríngeos del estado de Nuevo León, México. El microarreglo RPM-Flu 3.1 fue capaz de detectar la secuencia que codifica para la proteína de matriz del virus de influenza AH1N1 pandémica en la mayoría de las muestras y las secuencias que codifican para las proteínas NA, HA y proteínas no estructurales del virus de influenza AH1N1 pandémica en las restantes. Estas secuencias hibridaron a su secuencia complementaria en el microarreglo y por medio de la re-secuenciación se obtuvieron fragmentos de estas secuencias que corresponden a los patógenos identificados. Los resultados del microarreglo mostraron que de las 219 muestras positivas para Influenza AH1N1 pandémica por qPCR, 170 fueron confirmadas para influenza AH1N1 pandémica. Las secuencias nucleotídicas obtenidas con el Microarreglo RPM-Flu 3.1 no fueron capaces de detectar la presencia del virus de la influenza AH1N1 pandémica previamente analizadas por qPCR en 49 muestras descritas como negativas para AH1N1.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas por el RPM-Flu 3.1 presentaron puntajes C3 mayores a

10. Las muestras se identificaron como positivas cuando el puntaje C3 fue mayor a 20, en las muestras que presentaron un puntaje C3 de entre 10 y 20 se tuvo que analizar el valor de expectativa E para identificar a esas muestras como positivas. Todas las muestras cuyo puntaje C3 resultó entre 10 y 20 presentaron un valor de expectativa E menor a $1E-10$ identificando a esas muestras como positivas. Los resultados anteriores nos permitieron detectar la presencia de diferentes tipos y subtipos del virus de influenza AH1N1 pandémica.

Por otro lado, el comportamiento de la pandemia de influenza AH1N1 pandémica se caracterizó por una alta tasa de mortalidad que se le atribuyó a varios factores de la salud. En un estudio llevado a cabo en Estados Unidos (Louie et al., 2009), esta alta tasa de mortalidad se atribuye a la coinfección que presenta el virus de la influenza pandémica AH1N1 con otras bacterias, especialmente del género *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Staphylococcus*. Es por eso que esta tesis tuvo como uno de sus objetivos determinar las coinfecciones del virus de la influenza AH1N1 pandémica en México utilizando el microarreglo RPM-Flu 3.1 que permite la detección simultánea de una amplia variedad de bacterias y virus asociados a enfermedades respiratorias (Lin et al., 2009).

Los resultados obtenidos lograron determinar los géneros de bacterias y virus que presentan coinfección con influenza AH1N1 pandémica en el estado de Nuevo León. En las muestras analizadas se identificaron los géneros bacterianos y virales que presentaron coinfección con el virus de influenza AH1N1 pandémica los cuales fueron: *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Adenovirus*, *Herpesvirus* y *Klebsiella*. Estos resultados permitieron determinar la infección simultánea de patógenos asociados a influenza con las bacterias del género *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Pseudomonas*. Adicionalmente, también encontramos la presencia de *Adenovirus* en dos casos y estos casos presentaron una co-infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica.

Estos resultados son similares a los publicados en un estudio hecho por Casalegno et al., 2010, en donde los principales patógenos detectados fueron del género *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* así como casos aislados de *Adenovirus*. Nuestros resultados apoyan los estudios llevados a cabo en Estados Unidos (Louie et al., 2009) en el cual encontraron que las bacterias del género *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Staphylococcus* en coinfección con el virus de influenza AH1N1 pandémica. Así mismo, en España (Cilloniz et al., 2012) encontraron a las bacterias del género *Streptococcus* y *Pseudomonas* presentando coinfección con el virus de influenza AH1N1 pandémica y en Argentina (Palacios et al., 2009) las bacterias del género *Haemophilus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* presentaron coinfección con el virus de influenza AH1N1 pandémica. Es importante mencionar que además de las bacterias del género

Streptococcus, *Haemophilus*, *Pseudomonas* y *Neisseria* se observó una coinfección entre el virus de influenza AH1N1 pandémica con el género de bacteria *Staphylococcus* en las poblaciones del estado de Nuevo León. El género *Staphylococcus* ya estaba descrito en la literatura como patógeno que presenta coinfección con el virus de influenza tanto como en la Influenza estacional o la pandémica. La bacteria *Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista asociada a infecciones del tracto respiratorio y causante de infecciones respiratorias en países sub-desarrollados debido probablemente a la falta de higiene, mala alimentación y falta de atención médica. *Staphylococcus aureus* es un agente ampliamente diseminado constituyendo parte de la flora comensal del ser humano, principalmente en la piel de axilas, ingles, periné y fosas nasales. La portación nasal ha sido reconocida como importante en la epidemiología de la infección estafilocócica desde hace décadas, siendo el mejor indicador de colonización y potencial de diseminación del agente. Este constituye el principal reservorio del microorganismo, desde donde coloniza las otras áreas de la piel y las manos del personal de salud, que son el vehículo de contagio a otros pacientes en el caso de pacientes hospitalizados (Mendoza, et al., 2000).

La bacteria *Neisseria meningitidis* es un patógeno asociada a infecciones del tracto respiratorio y que en algunos casos puede presentarse en la flora nasofaríngea y puede causar complicaciones graves a la salud. Hasta el momento de forma global no se ha reportado que *Neisseria* sea un patógeno que se presente frecuentemente en la coinfección con Influenza, sin embargo en el presente trabajo y en trabajos anteriores, se llegaron a observar cierto número de casos y una correlación significativa con esta bacteria, tanto para Influenza AH1N1 en la población del norte y sur de México (Willis, 2013) como para Influenza B en la población del norte y sur del país (Rodríguez, 2014) esto nos puede indicar que la población mexicana tiene cierta predisposición a la coinfección con *Neisseria*, las causas podrían estar relacionadas con los hábitos de higiene, atención médica deficiente o incluso podría estar relacionado a la alimentación.

En cuanto a los porcentajes de los casos que presentaron coinfección de influenza AH1N1 pandémica con bacterias asociadas a enfermedades respiratorias que fueron del 34% para *Streptococcus pneumoniae* y 15% para *Pseudomonas aeruginosa*, esto concuerda con los estudios de España (Cilloniz et al., 2012) y Estados Unidos (Louie et al., 2009) ya que mencionan porcentajes del 33 y 25% respectivamente para *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los resultados obtenidos en ésta tesis muestran que el 59% de las muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica presentan una coinfección con bacterias asociadas a enfermedades respiratorias, Se considera que el 59% de muestras positivas que presentan coinfección es un porcentaje alto en comparación a otros estudios que reportan de un 18% hasta un 33%

dependiendo el patógeno bacteriano (Torres 2012, Rong-Yang, 2012 y Morales de León et al, 2009) y este resultado podría atribuirse a que durante el procesamiento de las muestras se logró optimizar el paso de PCR Multiplex aumentando de número de ciclos de amplificación y con esto aumentar el número de fragmentos amplificados y así contribuir al aumento de la sensibilidad del microarreglo ya que se sabe que esta técnica tiene un mayor porcentaje de especificidad (98%) que de sensibilidad (95%) comparado con otras técnicas de detección como el PCR tiempo real, así mismo el aumento en el porcentaje de las muestras que presentan coinfección también podría atribuirse a características de la población como las diferencias socio-económicas y culturales entre países que tienen un efecto en la salud y la higiene.

La vigilancia epidemiológica deberá de continuar realizándose ya que el virus de influenza A humano puede llegar a sufrir reordenamientos de sus segmentos con otros tipos de virus de influenza como la influenza aviar, generando una nueva cepa del virus de influenza A y generando a su vez una nueva pandemia (Fanning et al., 2002). Se espera que esta nueva pandemia sea aun más agresiva debido a la falta de respuesta inmune de la población humana ante este virus.

Los resultados obtenidos nos permitieron identificar mayormente al subtipo de influenza AH1N1 pandémica en la población del Noreste de México debido a que la gran mayoría de los casos analizados (170 de 219) presentó infección del virus de influenza AH1N1 pandémica, esto concuerda con lo reportado por PAHO/OPS, 2015 indicando la alta prevalencia de este subtipo en el estado de Nuevo León. Demostrando que este subtipo del virus de influenza sigue circulando en México afectando principalmente a niños pequeños, ancianos, pacientes inmunosuprimidos y las personas con enfermedad subyacente, como una enfermedad cardíaca o asma en la temporada de invierno. En cuanto a las edades de las personas que sufrieron hospitalizaciones y muertes en la pandemia del virus de influenza AH1N1 pandémica nuestros resultados concuerdan con lo observado en un estudio realizado por Chowell et al., 2011, donde indican que la población más afectada fue la población adulta activa. Estos autores mencionan que en los tres primeros brotes que ocurrieron en el 2009, el mayor número de hospitalizaciones por influenza AH1N1 pandémica se presentó en la población adulta activa mientras que en el brote que ocurrió a finales del 2011 fueron los adultos de edad avanzada. Estos resultados también concuerdan con las edades de los pacientes de nuestras muestras ya que la gran mayoría de los pacientes que sufrieron una infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica en el 2009 resultaron estar entre los 20 y 60 años de edad mientras que la población más afectada a finales del 2011 fueron los niños y ancianos. Esto podría explicarse debido a una inmunización por parte de la población adulta activa con el virus de influenza AH1N1 pandémica en el 2009 y/ o por las campañas de vacunación que se llevaron a cabo en el 2010.

11. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de ésta tesis permitieron:

- 1) Detectar la presencia del virus influenza AH1N1 en el 78% de las muestras del Noreste de México analizadas.
- 2) Determinar la infección simultánea de patógenos asociados a influenza con los patógenos de los géneros: *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Adenovirus*, *Mycoplasma*, *Herpesvirus* y *Klebsiella*.
- 3) Detectar en el 59% de las muestras con Influenza AH1N1 uno o más patógenos asociados a enfermedades respiratorias, de los cuales el mayor porcentaje (23%) se encontraron asociados a un solo patógeno, seguido de dos con 19%, tres con 15% y cuatro patógenos en el 2%.
- 4) Analizar la asociación más frecuente del virus de Influenza AH1N1 en la población de Nuevo León con los patógenos de los géneros *Streptococcus* (37.4%), *Haemophilus* (30.1%) y *Pseudomonas* (20%).
- 5) Determinar la correlación positiva entre el virus de Influenza AH1N1 y la coinfección con los patógenos identificados de los géneros *Streptococcus* (0.724), *Haemophilus* (0.520) y *Neisseria* (0.572).

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad para detectar la aparición de nuevos re-arreglos específicos al gen de matriz, Neuraminidasa y Hemaglutinina del virus de influenza AH1N1 pandémica en pacientes del estado de Nuevo León en México. Además de también puede continuarse la vigilancia epidemiológica analizando la variabilidad de los genes de Neuraminidasa y Hemaglutinina así como identificando los tipos y subtipos del virus de influenza AH1N1 pandémica.

12. REFERENCIAS

- Bouvier NM, Palese P. 2008. Oseltamivir-resistant novel influenza A (H1N1) virus infection in two immunosuppressed patients. *The biology of influenza viruses*. CDC 58:893-896.
- Suzuki Y. 2005. Sialobiology of Influenza Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28(3) 399-408.
- De Jong, M. D, Hien T. 2006 Avian Influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 35, 2-13.
- Hilleman M. 2002. Realities and enigmas of human viral Influenza: pathogenesis, epidemiology and control , *Vaccine*, p-3068-3087.
- Fanning T, Slemons R, Reid A. 2002. 1917 Avian Influenza Virus Sequences Suggest that the 1918 Pandemic Virus Did Not Acquire Its Hemagglutinin Directly from Birds. *Journal of Virology*, Aug. p.7860-7862.
- Pinon RA, Oropesa FS, Aragonés LC. 2005. Influenza y vacunación. *Rev Biomed*; 16 (1): 45-53.
- Torres A, Cilloniz C, Ewig S. 2012. Bacterial Co-infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *Journal of Infection*. 65, 223-230.
- Brundage J, Shanks D. 2008. Deaths from Bacterial Pneumonia during 1918-19 Influenza Pandemic. *Emerging Infectious Diseases*. Vol.14, No. 8, 1193-1199.
- Sebastian MR, Lodha R, Kabra SK. 2009. Swine Origin Influenza (Swine Flu) *Indian J Pediatr.* 76: 833-841.
- Metzgar D, Myers CA, Russell KL, Faix D, Blair PJ. 2010. Single Assay for Simultaneous Detection and Differential Identification of Human and Avian Influenza Virus Types, Subtypes, and Emergent Variants. *PLoS ONE* 5(2): e8995.

Lin B, Malanoski AP, Wang Z, Blaney KM, Long NC, Meador CE, Metzgar D, Myers CA, Yingst SL, Monteville MR, Saad MD, Schnur JM, Tibbetts C, Stenger DA. 2009. Universal detection and identification of avian influenza virus by use of resequencing microarrays. *J Clin Microbiol.*47(4):988-93.

Wang Z, Malanoski AP, Lin B, Kidd C, Long NC, Blaney KM, Thach DC, Tibbetts C, Stenger DA. 2008. Resequencing microarray probe design for typing genetically diverse viruses: human rhinoviruses and enteroviruses. *BMC Genomics.*1;9:577

Lin B, Mahony JB, Hatchette T, Ojkic D, Drews SJ, Gubbay J, Low DE, Petric M, Tang P, Chong S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M. 2009. Multiplex PCR tests sentinel the appearance of pandemic influenza viruses including H1N1 swine influenza. *J Clin Virol.* 45(3):200-2.

Wang Z, Malanoski AP, Lin B, Kidd C, Long NC, Blaney KM, Thach DC, Tibbetts C, Stenger DA. 2008. Resequencing microarray probe design for typing genetically diverse viruses: human rhinoviruses and enteroviruses. *BMC Genomics.*1;9:577

Wang XY, Kilgore PE, Ah Lim K, et al. 2011. Influenza and bacterial pathogen coinfections in the 20th century. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2011: 1 – 6.

Metzgar D, Myers CA, Russell KL, Faix D, Blair PJ. 2010. Single Assay for Simultaneous Detection and Differential Identification of Human and Avian Influenza Virus Types, Subtypes, and Emergent Variants. *PLoS ONE* 5(2): e8995.

Lin B, Malanoski AP, Wang Z, Blaney KM, Long NC, Meador CE, Metzgar D, Myers CA, Yingst SL, Monteville MR, Saad MD, Schnur JM, Tibbetts C, Stenger DA. 2009. Universal detection and identification of avian influenza virus by use of resequencing microarrays. *J Clin Microbiol.*47(4):988-93.

Philippe RS, Lagacé-Wiens, Ethan Rubinstein, Abba Gumel 2010. Influenza epidemiology – past, present, and future. *Clinical issues. Control care medicine.* 38:4-10.

Biere B, Bauer B and Schweiger B. 2010. Differentiation of influenza B virus lineages Yamagata and Victoria by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 48:1425-1427.

Simonsen L, Fukuda K. 2000. The Impact of influenza epidemic on hospitalizations. *The Journal of Infectious Diseases* 181; 831-837.

Rong-Yang J, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Lin YC, Huang HY, Wu FT, Wu HS, Liu MT. 2012. Phylogenetic and evolutionary history of influenza B viruses, which caused a large epidemic in 2011 – 2012, Taiwan. *PLoS ONE* 7:1 – 10.

Bouvier NM, Palese P. 2008. Oseltamivir-resistant novel influenza A (H1N1) virus infection in two immuno-suppressed patients. *The biology of influenza viruses*. *CDC* 58:893-896.

Bouvier N, Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 4: D49 – D53.

Fanning T, Slemons R, Reid A. 2002. 1917 Avian Influenza Virus Sequences Suggest that the 1918 Pandemic Virus Did Not Acquire Its Hemagglutinin Directly from Birds. *Journal of Virology* 7860-7862.

Maeno K. 1994. Replication of influenza B virus: Biological functions of viral neuraminidase. *Nagoya Journal of Medical Sciences* 57:1-17.

Kanegae Y, Sugita S, Endo A, et al. 1990. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: Cocirculating lineages in the same epidemic season. *Journal of Virology* 64:2860-2865.

König R, Stertz S, Zhou Y, et al. 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463:813-817.

Torres A, Cilloniz C, Ewig S. 2012. Bacterial Co-infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *Journal of Infection* 65: 223-230.

Willis, C. 2013. Identificación de tipos y subtipos del virus de influenza y su coinfección con patógenos asociados a enfermedades respiratorias mediante re-secuenciación con microarreglos, Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Rodríguez, A. 2014. Detección del virus de influenza B y otros patógenos asociados con enfermedades respiratorias en pacientes de Nuevo León y Oaxaca mediante microarreglos de DNA y re-secuenciación, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Grohskopf LA, Shay DK, Shimabukuro TT, et al. 2013. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. *Morbidity and mortality report*, 62(7). [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6207.pdf> (Diciembre, 2013)

Herrmann B, Larsson C and Wirgart B. 2001. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: Comparison to virus isolation and antigen detection by Immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *Journal of Clinical Microbiology* 39:134-138.

Quan PL, Palacios G, Jabado OJ, et al. 2007. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2359-2364.

Van Elden LJR, Nijhuis M, Schipper P. 2001. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using Real-Time quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology* 39: 196 – 200.

Leski TA, Ansumana R, Jimmy DH. 2011. Massively multiplexed microbial

identification using resequencing DNA microarrays for outbreak investigation. Research report. Mercy hospital research laboratory 8029:902 – 904.

WHO - Current WHO phase of pandemic alert. 2009. [Online] Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase/en/print.html

WHO - Influenza update. 2013. [Online] Disponible en: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/index.html

CDC - What you should know for the 2012-2013 influenza season. 2013. [Online] Disponible en: <http://www.cdc.gov/flu/about/season/flu-season-2013-2014.htm>

WHO - Influenza update. 2014. [Online] Disponible en: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/index.html

CDC - What you should know for the 2014-2015 influenza season. 2014. [Online] Disponible en: <http://www.cdc.gov/flu/about/season/flu-season-2014-2015.htm>

CDC – Pruebas de diagnóstico rápido de influenza. 2013. [Online] Disponible en: <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm>

OPS – Actualización regional: Influenza y otros virus respiratorios. 2013. [Online] Disponible en: <http://www.paho.org/reportesinfluenza>

SINAVE/DGE/Sistema de vigilancia epidemiológica de influenza – Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2014/influenza/influenza14_33.html

PAHO/OPS | Influenza Regional Update /Actualización Regional de Influenza, 2015.

OPS – Actualización regional: Influenza y otros virus respiratorios. 2016. [Online] Disponible en: <http://www.paho.org/reportesinfluenza>

WHO - Influenza update. 2017. [Online] Disponibile en: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/index.html